



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE SOLOS  
BRASILEIROS E ESTUDO DE SUAS INTERAÇÕES COM ANTIMICROBIANOS DE  
USO VETERINÁRIO**

**CAMPINAS  
2017**

**MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE SOLOS E  
ESTUDO DE SUAS INTERAÇÕES COM ANTIMICROBIANOS DE USO  
VETERINÁRIO**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora  
em Ciências**

**Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. SUSANNE RATH**

**CAMPINAS**

**2017**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 159676/2013-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

M366i      Martínez Mejía, Monica Johanna, 1987-  
                Isolamento e caracterização de ácidos húmicos de solos brasileiros e  
                estudo de suas interações com antimicrobianos de uso veterinário / Monica  
                Johanna Martínez Mejía. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

                Orientador: Susanne Rath.  
                Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
                Química.

                1. Ácido húmico. 2. Fármacos veterinários. 3. FT-ICR MS. 4. Sorção. 5.  
                Solos. I. Rath, Susanne, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
                Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Isolation and characterization of humic acids from brazilian soils  
and studies on interaction between humic acids and veterinary drugs

**Palavras-chave em inglês:**

Humic acid

Veterinary drugs

FT-ICR-MS

Sorption

Soils

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Susanne Rath [Orientador]

Anne Helene Fostier

Fabio Cesar Gozzo

Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Monica Ferreira de Abreu

**Data de defesa:** 14-12-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)

Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (IQ-UNESP-Araraquara)

Profa. Dra. Monica Ferreira de Abreu (Instituto Agrônômico de Campinas)

Profa. Dra. Anne Helene Fostier (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo(a) aluno(a) **MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 14 de dezembro de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro aos projetos.

À minha orientadora, a professora Dra. Susanne Rath, por seus ensinamentos durante meu mestrado e doutorado; muito obrigado por sua confiança no meu trabalho e sua oportuna orientação.

Ao Instituto de Química da UNICAMP e aos funcionários dos laboratórios institucionais multiusuários: Lab. Adsorção Física e CHN, Lab. Análise Térmica, Lab. Difração de Raios-X, Lab. Espectroscopia UV Vis-NIR e o Lab. RMN.

Ao professor Dr. Marcos Nogueira Eberlin e colaboradores do Laboratório de Espectrometria de Massas Thomson da UNICAMP.

Ao Dr. Ademir Fontana, pesquisador da EMBRAPA do Rio de Janeiro, que nos cedeu às amostras de ácidos húmicos.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo auxílio na coleta das amostras de solo e caracterização das mesmas.

Aos amigos do Laboratório Bioanalítica Paracelsus pela convivência e ensinamentos.

À Isabela agradeço por sua participação neste trabalho; foi um prazer fazer parte de seu trabalho de iniciação científica.

As grandes amigas que levarei sempre no coração Menis, Na, Zuzu Tamy e Garota.

À minha família no Brasil Kathe, Alexa, Laidy, Daniel e Alejo. A meu amor Jose Javier com quem comparto mis alegrias e tristezas, mas também obrigada por sua ajuda na execução deste trabalho.

À Deus e a minha família.

Por último e mais importante de toda a minha vida - minha mãe.

## RESUMO

A mobilidade de antimicrobianos no solo depende, dentre outros fatores, das propriedades físico-químicas do fármaco e das características intrínsecas do solo, em particular, do teor de matéria orgânica do solo e composição química dos ácidos húmicos (HA) presentes no mesmo. O objetivo do presente trabalho foi elucidar os possíveis mecanismos e os fatores-chave que governam a sorção de antimicrobianos em HA extraídos de solos brasileiros. Os fármacos selecionados foram da família das fluoroquinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) e sulfonamidas (sulfaquinoxalina) e os HA foram extraídos de argilossolos, latossolos, neossolos quartzarênicos, organossolos, cambissolos, espodossolos e gleissolos.

Os estudos de sorção das fluoroquinolonas nos HA do solo revelaram elevados valores de coeficientes de sorção ( $K_F$ ), na faixa de 5000 a 27000  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ , indicando uma alta afinidade destes compostos quando comparado com as sulfonamidas (sulfaquinoxalina,  $1030 \leq K_F \leq 853 \mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ ).

Os HA foram extraídos dos solos segundo procedimento da IHSS e caracterizados por técnicas de análise elementar, espectroscopia por refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido e espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier. Para a interpretação dos resultados foram empregadas ferramentas quimiométricas e construídos diagramas de van Krevelen, gráficos de classes, gráficos de DBE/C e gráficos de defeitos de massa de Kendrick. As análises mostraram que a composição dos HA ao nível molecular é bastante variada. As diferenças na composição química dos HA explicam o potencial de sorção exibido. A capacidade de sorção das fluoroquinolonas nos HA está correlacionada com a presença de compostos heterocíclicos nitrogenados e hidrogênio deficientes, e não é meramente determinada pela presença de grupos ácidos carboxílicos como até então reportado.

Os íons identificados nos espectros de massas com fórmulas moleculares  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$  (DBE = 12) e  $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$  (DBE = 14) as quais apresentam um alto grau de instauração, foram indicadas como moléculas responsáveis pela

formação de complexos ternários com as fluoroquinolonas fazendo com que estes compostos exibam uma alta retenção no solo e possível acumulação nos mesmos.

## ABSTRACT

The mobility of antimicrobials in soil depends, among other factors, on the physicochemical properties of the drug and on the intrinsic characteristics of the soil, in particular, the organic matter content of the soil and the chemical composition of the humic acids present in them. The objective of the present work was to elucidate the possible mechanisms and the key factors that govern the sorption of antimicrobials in HAs extracted from Brazilian soils. The selected drugs were from the fluoroquinolone family (enrofloxacin and ciprofloxacin) and sulfonamides (sulfaquinoxaline) and the HAs were extracted from *Latossolos*, *Neossolos*, *Podzólicos*, *Organossolos* and *Cambissolos*.

The sorption studies of fluoroquinolones in soil HAs revealed high values of sorption coefficients ( $K_F$ ), in the range of 5000 to 27000  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ , indicating a high affinity of these compounds when compared to the sulfonamides (sulfaquinoxaline,  $1030 \leq K_F \leq 853 \mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ ).

The HAs were extracted from the soils according to the procedure recommended by the IHSS and characterized by techniques such as elemental analysis, attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, solid state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. For the interpretation of the results, chemometric tools were used and van Krevelen diagrams, class graphs, DBE / C graphs and Kendrick mass defect graphs were constructed. The analyzes showed that the composition of HA at the molecular level is quite varied. Differences in the chemical composition of HA explain the differences in the sorption potential of the molecules evaluated. The sorption capacity of fluoroquinolones ion HA is correlated with the presence of nitrogen and hydrogen-deficient heterocyclic compounds, and is not merely determined by the presence of carboxylic acid groups previously reported.

The ions identified in mass spectra with molecular formulas  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$  (DBE = 12) and  $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$  (DBE = 14) which have a high degree of unsaturation have been indicated as molecules responsible for the formation of ternary complexes with fluoroquinolones, which explains the high affinity to the soil and possible accumulation in them.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição dos solos no mundo. Adaptada da <i>FAO-UNESCO Soil Map of the World using the USDA soil taxonomy</i> . Os solos na região vermelha correspondem a Latossolos, em magenta espodossolos e amarelo Argissolos (Ultisols). .....	<b>37</b>
<b>Figura 2</b> – Modelo de ácido húmico proposto por Fuchs. Adaptado de Jansen et al. (1996). .....	<b>40</b>
<b>Figura 3</b> – Modelo de HA proposto por Dragunov. Adaptado de Al-Faiyz (2013)...	<b>40</b>
<b>Figura 4</b> – Modelo estrutural de HA proposto por Schulten e Schnitzer. Adaptado de Schulten e Schnitzer (1995). .....	<b>41</b>
<b>Figura 5</b> – Esquema do procedimento adotado para a avaliação da sorção e desorção de ENR, CIP e SQX nos HA. ....	<b>71</b>
<b>Figura 6</b> - Espectros usando a técnica de $^{13}\text{C}$ NMR para os HA-LV(N <sub>2</sub> ) e HA-LVAd extraídos dos solos coletados. ....	<b>89</b>
<b>Figura 7</b> - Cromatogramas de CIP e ENR em solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L <sup>-1</sup> e nos extratos dos HA do solo LVAd (para a CIP) e LVe (para a ENR) (razão de 4 mg de HA para 10 mL de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L <sup>-1</sup> ). A concentração de ENR e CIP foi de 0,5 µg mL <sup>-1</sup> . Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 Zorbax Eclipse Plus a 40 °C, fase móvel metanol:ácido fórmico 0,1% 70:30 (v/v), no modo isocrático, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda emissão e excitação de 277 nm e 440 nm, respectivamente. ....	<b>94</b>
<b>Figura 8</b> - Efeito do pH na resposta cromatográfica obtida para a ENR na análise do extrato fortificado do HA-LVAd. ....	<b>95</b>
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas de ENR em solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L <sup>-1</sup> , no extrato do HA-LVe (razão de 4 mg de HA para 10 mL de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L <sup>-1</sup> ) fortificado com ENR e no extrato fortificado com ENR e adição de EDTA. A concentração de ENR foi de 0,5 µg mL <sup>-1</sup> . Condições cromatográficas: coluna C18 Zorbax Eclipse Plus a 40 °C, fase móvel metanol:ácido fórmico 0,1% 70:30 (v/v), no modo isocrático, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda emissão e excitação de 277 nm e 440 nm, respectivamente. ....	<b>96</b>
<b>Figura 10</b> - Cinéticas de sorção de ENR e CIP nos HA-LVad, HA-LVe e HA-RQo. .	<b>99</b>
<b>Figura 11</b> – Gráfico de cinética de sorção. Representa a quantidade de SQX sorvida nos HA extraídos do solo LVAd em função do tempo. ....	<b>102</b>

<b>Figura 12</b> - Isotermas de sorção modeladas pela equação de Freundlich, na forma logarítmica (A) e linear (B) para ENR, CIP e SQX nos HA do solo LVAd, LVe e RQo. ....	<b>105</b>
<b>Figura 13</b> - Especiação da ENR em função do pH; $pK_{a1}$ 5,9 e $pK_{a2}$ 8,0. ....	<b>109</b>
<b>Figura 14</b> - Possíveis vias e mecanismos de interação das FQ nos HA. Adaptado de Martinez-Mejia et al. (2017).....	<b>110</b>
<b>Figura 15</b> - Valores dos coeficientes de distribuição $K_D$ ( $K_D$ , L kg <sup>-1</sup> ) em função do pH para a sorção de ENR em HA extraídos dos solos. (As barras de erro representam as estimativas dos desvios padrão da análise em triplicata). Condições da isoterma: CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> .....	<b>111</b>
<b>Figura 16</b> - Valores dos coeficientes de distribuição $K_D$ (L kg <sup>-1</sup> ) em função da concentração de CaCl <sub>2</sub> (As barras de erro representam os desvios das análises realizadas em triplicata). Condições da isoterma: pH natural do solo. ....	<b>113</b>
<b>Figura 17</b> - Valores dos coeficientes de distribuição $K_D$ (L kg <sup>-1</sup> ) em função do eletrólito no estudo de sorção da ENR nos HA extraídos dos solos LVAd, LVe e RQo.....	<b>115</b>
<b>Figura 18</b> - Espectros de ATR-FTIR dos HA isolados dos solos. A: solos LVAd, LVe, LV(N2), LVA (S1), PVA e RQo e B: solos GM(PM), O(RJ2), EK(RO), OX(SC!) e OXs(SP1). ....	<b>122</b>
<b>Figura 19</b> - Espectros de ATR-FTIR dos HA (na ordem) LVAd, LVA(S1), PVA(S2), RQo e EK(RO) após pré-tratamento(método de correção multiplicativa de sinal). .	<b>125</b>
<b>Figura 20</b> - Espectros de ATR-FTIR do total de HA avaliados, após pré-tratamento: centralização na média, o MSC e primeira derivada. Destacam-se em cor azul e rosa as frequências que identificam cada um dos grupos do PCA. ....	<b>126</b>
<b>Figura 21</b> - Gráfico de <i>scores</i> da análise de PCA dos espectros ATR-FTIR dos HA extraídos de diferentes solos e sedimentos. ....	<b>127</b>
<b>Figura 22</b> - Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 e PC2) da análise de PCA dos espectros ATR-FTIR dos HA extraídos dos solos.....	<b>128</b>
<b>Figura 23</b> - Espectros de ATR-FTIR das amostras diferenciadas pelo PC1 (PVA(S2), LVe e LVAd), assim como aquelas que foram separadas pela PC2 (OXs(SP1), OX(SC1) e EK(RS1)). No gráfico são indicadas as frequências responsáveis pela separação dos grupos no PCA.....	<b>129</b>

<b>Figura 24</b> - Espectro de massas de alta resolução obtido por (+) ESI FT-ICR MS característica do HA-RQo. É apresentada também a expansão da massa nominal a 495 $m/z$ .....	<b>132</b>
<b>Figura 25</b> – Distribuição de classes de compostos e número de fórmulas moleculares atribuídas obtidos por FT-ICR MS das amostras de HA-RQo e HA-LVAd, empregando três procedimentos de preparo de amostras. Procedimento A: solubilização do HA úmido em metanol adicionado de 20% de $\text{NH}_4\text{OH}$ ; (B) solubilização do HA seco e liofilizado em metanol adicionado de 20% de $\text{NH}_4\text{OH}$ e (C) idêntico ao B, no entanto, incluindo um processo adicional de <i>clean-up</i> usando resina de troca catiônica (Dowex® 50WX8).....	<b>134</b>
<b>Figura 26</b> - Diagramas de van Krevelen. As cores representam os tipos de compostos: preto para CHO, vermelho para CHOS, verde para CHON, azul para CHOCI. As fórmulas moleculares plotadas no diagrama podem ser classificadas em seis regiões assinadas: lipídeos ( $\text{H/C} = 1,5\text{--}2,0$ , $\text{O/C} = 0\text{--}0,3$ ), proteínas e outros alifáticos ( $\text{H/C} = 1,5\text{--}2,2$ , $\text{O/C} = 0,1\text{--}0,67$ ), ligninas ( $\text{H/C} = 0,7\text{--}1,5$ , $\text{O/C} = 0,1\text{--}0,67$ ), aromáticos condensados ( $\text{H/C} = 0,2\text{--}0,7$ , $\text{O/C} = 0\text{--}0,67$ ), carboidratos ( $\text{H/C} = 1,5\text{--}2,4$ , $\text{O/C} = 0,67\text{--}1,2$ ), e hidrocarboneto insaturados ( $\text{H/C} = 0,7\text{--}1,5$ , $\text{O/C} = 0\text{--}0,1$ ). Os métodos de preparo estão designados como A, B e C. ....	<b>136</b>
<b>Figura 27</b> – Espectros de massas de alta resolução obtido por (+) ESI FT-ICR MS do HA-LV(N2) e o HA-OXs(SP1).....	<b>138</b>
<b>Figura 28</b> - Gráfico de barras representando o número de fórmulas moleculares correspondente a cada grupo de compostos (CHO e CHON), para os HA OXs(SP1), EK(RO), PVA(S2), CH(MB4) e OX(MS2). ....	<b>139</b>
<b>Figura 29</b> - Gráfico de barras representando o número de fórmulas moleculares correspondente a cada grupo de compostos (CHO e CHON). Das amostras de LVe, LVAd, OX(SC1), RQo, O(RJ2), LV(N2), GM(PM) e RQ(N1) .....	<b>140</b>
<b>Figura 30</b> - Diagrama de van Krevelen das amostras de HA extraído dos solos LVAd e RQo. Na figura são delimitadas as regiões correspondentes a moléculas alifáticas contendo carboxilas (CCAM), moléculas aromáticas condensadas (BC) e região de ligninas. As linhas são os limiares de 0,5 e 0,67 para DBE/C e para $\text{A}_i$ .....	<b>143</b>
<b>Figura 31</b> - Distribuição relativa de fórmulas moleculares dos HA avaliados, referentes às três regiões identificadas no diagrama de van Krevelen (moléculas alifáticas contendo carboxila-CCAM, compostos semelhantes a lignina-LIG, e compostos condensados aromáticos-BC). (A) número de fórmulas moleculares	

correspondentes a cada região do diagrama. e a (B) mostra a intensidade relativa das fórmulas moleculares correspondentes a cada região do diagrama. ....	145
<b>Figura 32-</b> Gráfico de <i>scores</i> do PCA dos espectros de massas dos HA, O Grupo A está denotado pela cor rosa, o Grupo B pela cor roxa e Grupo D pela cor verde...	147
<b>Figura 33-</b> Gráfico de <i>loadings</i> da análise de PCA dos espectros de massas dos HA, as fórmulas moleculares de maior peso na separação dos grupos são apresentadas mediante os gráficos de <i>box-plot</i> . Os grupos separados mediante o PCA são identificados como Grupo A, B e D. ....	148
<b>Figura 34-</b> Gráficos de defeito de massa de Kendrick de COO para as amostras de HA LV(N2) (Grupo a do PCA), OXs(SP1) (Grupo 2 do PCA) e O(RJ2) (grupo 3 do PCA), As cores representam os tipos de compostos, preto para CHO, vermelho para CHOS, verde para CHON, azul para CHOCI. ....	150
<b>Figura 35-</b> Possíveis formas estruturais, correspondentes às fórmulas moleculares identificadas como principais responsáveis de promover a sorção de FQ em HA do solo.....	152
<b>Figura 36-</b> Gráficos de DBE/C vs intensidade relativa para cada fórmula molecular atribuída. ....	153

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Propriedades físico-químicas e texturais dos solos coletados. ....	<b>85</b>
<b>Tabela 2</b> - Análise da composição elementar dos ácidos húmicos. ....	<b>86</b>
<b>Tabela 3</b> - Integração das áreas correspondentes aos grupamentos funcionais por meio da análise de $^{13}\text{C}$ NMR nos HA extraídos dos solos coletados no estado de São Paulo. ....	<b>91</b>
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros cinéticos de sorção dos fármacos avaliados nos HA. ....	<b>101</b>
<b>Tabela 5</b> - Resultados dos parâmetros de validação do método de quantificação dos fármacos em soluções de HA. ....	<b>103</b>
<b>Tabela 6</b> - Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich ( $K_F$ e $1/n$ ), para os fármacos avaliados nos diferentes HA extraídos. ....	<b>106</b>
<b>Tabela 7</b> - Coeficientes de sorção de Freundlich para ENR nos solos e no HA extraídos destes solos. ....	<b>108</b>
<b>Tabela 8</b> - Propriedades físico-químicas dos solos dos quais os ácidos húmicos foram extraídos. ....	<b>118</b>
<b>Tabela 9</b> - Valores obtidos para coeficiente de distribuição ( $K_D$ ) para os fármacos avaliados em os diferentes HA. ....	<b>119</b>
<b>Tabela 10</b> - Índices de aromaticidade, reatividade, amida e policondensação dos HA, calculados a partir dos espectros ATR-FTIR. ....	<b>123</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AI</b>	Índice de aromaticidade
<b>ATR-FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho no modo de reflectância total atenuada (do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ).
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CPMAS <sup>13</sup>C</b>	<i>Cross Polarization Magic Angle Spinning <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>CIPAN</b>	Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos
<b>CPVS</b>	Compêndio de Produtos Veterinários
<b>DBE</b>	<i>Double bond equivalent</i>
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês, <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EMEA</b>	Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (do inglês, <i>European Agency for the Evaluation of Medical Products</i> )
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>ENR</b>	Enrofloxacin
<b>EPA</b>	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, <i>Environmental Protection Agency</i> )
<b>ESI</b>	Ionização por eletronebulização (do inglês <i>Electrospray ionization</i> )
<b>FA</b>	Ácidos fúlvicos (do inglês, <i>fulvic acids</i> )
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura ( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
<b>FDA</b>	Agência Norte Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FQ</b>	Fluoroquinolonas
<b>FT-ICR MS</b>	Espectrometria de massas de ultra-alta resolução de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> )

<b>HA</b>	Ácidos húmicos (do inglês, <i>humic acids</i> )
<b>HPLC-FLD</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector de fluorescência ( <i>High performance liquid chromatography with fluorescence detection</i> )
<b>HS</b>	Sustâncias húmicas (do inglês, <i>humic substances</i> )
<b>IAC</b>	Instituto Agronômico de Campinas
<b>ICR MS</b>	Ressonância ciclotrônica de íons (do inglês, <i>Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> ).
<b>IHSS</b>	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (do inglês, <i>International Humic Substances Society</i> )
<b>IR</b>	Espectroscopia no infravermelho (do inglês, <i>Infrared Spectroscopy</i> )
<b>KMD</b>	Defeitos de massas de Kendrick
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LDI</b>	Dessorção/ionização por laser (do inglês, <i>Laser Desorption Ionization</i> )
<b>LMR</b>	Limite máximo de resíduo
<b>MALDI</b>	Dessorção/ ionização a laser auxiliada por matriz (do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> )
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>NMR</b>	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> ).
<b>OECD</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> )
<b>OIE</b>	Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês, <i>World Organization for Animal Health</i> )
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês <i>World Health Organization</i> )
<b>ONU</b>	Assembleia Geral das Nações Unidas
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais
<b>PPO</b>	Pseudo-primeira-ordem

<b>PSO</b>	Pseudo-segunda-ordem
<b>py-GC-MS</b>	Pirólise acoplada a cromatografia a gás associada à espectrometria de massas
<b>SA</b>	Sulfonamidas
<b>SINDAN</b>	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
<b>SiBCS</b>	Sistema Brasileiro de Classificação de Solos
<b>SQX</b>	Sulfaquinoxalina
<b>SOM</b>	Matéria orgânica do solo (do inglês, <i>soil organic matter</i> )
<b>ToF</b>	Analisadores de tempo de voo (do inglês, <i>time-of-Flight</i> )
<b>UV/VIS</b>	Espectroscopia no ultravioleta visível
<b>VICH</b>	Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (do inglês, <i>Veterinary International Conference on Harmonization</i> )



## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>I.1.</b>	<b>Antimicrobianos veterinários no ambiente .....</b>	<b>22</b>
<b>I.1.1.</b>	<b>Antimicrobianos veterinários no ambiente: resistência bacteriana .....</b>	<b>24</b>
<b>I.2.</b>	<b>Transporte dos antimicrobianos no ambiente natural .....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.1.</b>	<b>Sorção de fármacos no solo.....</b>	<b>27</b>
<b>I.2.1.1.</b>	<b>Estudos de sorção de antimicrobianos veterinários no solo .....</b>	<b>29</b>
<b>I.2.2.</b>	<b>Fármacos veterinários da família das fluorquinolonas e sulfonamidas.....</b>	<b>31</b>
<b>I.2.3.</b>	<b>Elucidação dos mecanismos de sorção de FQ e SA no solo.....</b>	<b>33</b>
<b>I.3.</b>	<b>Características dos solos brasileiros .....</b>	<b>36</b>
<b>I.4.</b>	<b>Matéria orgânica do solo e substâncias húmicas.....</b>	<b>38</b>
<b>I.4.1.</b>	<b>Caracterização molecular dos ácidos húmicos do solo.....</b>	<b>39</b>
<b>I.4.1.1.</b>	<b>Análise do teor de carbono e análise elementar .....</b>	<b>43</b>
<b>I.4.1.2.</b>	<b>Técnicas espectroscópicas na região do UV-Vis.....</b>	<b>44</b>
<b>I.4.1.3.</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho .....</b>	<b>44</b>
<b>I.4.1.4.</b>	<b>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....</b>	<b>45</b>
<b>I.4.1.5.</b>	<b>Espectroscopia de fluorescência.....</b>	<b>46</b>
<b>I.4.2.</b>	<b>Espectrometria de massas .....</b>	<b>46</b>
<b>I.4.2.1.</b>	<b>Métodos de ionização em espectrometria de massas de alta resolução para a caracterização dos ácidos húmicos .....</b>	<b>47</b>
<b>I.4.2.2.</b>	<b>Analísadores de massas usados para a caracterização das substâncias húmicas .....</b>	<b>48</b>
<b>I.4.3.</b>	<b>Espectrometria de massas de ultra-alta resolução de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT -ICR MS).....</b>	<b>50</b>
<b>I.4.3.1.</b>	<b>Parâmetros experimentais do ESI FT ICR para a caracterização das substâncias húmicas .....</b>	<b>51</b>
<b>I.4.3.1.1.</b>	<b>Composição do Spray do ESI.....</b>	<b>51</b>
<b>I.4.3.1.2.</b>	<b>Potencial de ionização do ESI.....</b>	<b>52</b>

I.4.3.1.3. Compilação das informações dos espectros de massa de substâncias húmicas adquiridos no FT-ICR MS .....	52
I.4.3.1.4. Apresentação de resultados dos espectros de massas das HA .....	55
II. OBJETIVOS.....	61
III.1. Equipamentos, reagentes e amostras .....	64
III.1.1. Equipamentos .....	64
III.1.2. Padrões, solventes e reagentes e soluções.....	64
III.1.3. Amostras: solos e ácidos húmicos.....	65
III.2. Procedimento Experimental .....	66
III.2.1. Isolamento dos HA dos solos .....	66
III.2.2. Caracterização molecular dos ácidos húmicos .....	68
III.2.2.1. Análise elementar .....	68
III.2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido.. .....	68
III.2.3. Método para a determinação dos fármacos em extrato de ácidos húmicos por HPLC-DAD-FLD .....	68
III.2.4. Avaliação do potencial de sorção dos fármacos nos ácidos húmicos .....	69
III.2.5. Estudos preliminares .....	71
III.2.5.1. Avaliação do efeito matriz .....	72
III.2.5.2. Estabilidade dos fármacos na solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$ .....	72
III.2.5.3. Determinação da razão ácido húmico/ solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$ .....	73
III.2.5.4. Determinação do tempo de equilíbrio aparente (cinética de sorção).....	74
III.2.6. Validação do método cromatográfico.....	75
III.2.7. Isotermas de sorção e dessorção dos fármacos nos HA extraídos do solo .....	76
III.2.7.1. Avaliação do efeito do pH no coeficiente de sorção .....	76
III.2.7.2. Avaliação do tipo e concentração de eletrólito.....	77
III.2.7.3. Isotermas de dessorção .....	77
III.2.7.4. Modelagem das isotermas de sorção.....	77
III.2.8. Estudo comparativo dos coeficientes de sorção.....	78
III.3. Caracterização molecular dos HA e abordagem multivariada .....	79

III.3.1. Espectroscopia por refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	79
III.3.1.1. Tratamento de dados e análise multivariado .....	80
III.3.2. Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FT -ICR MS) .....	80
III.3.2.1. Desenvolvimento do método para análise dos ácidos húmicos por FT-ICR MS .....	80
III.3.2.2. Tratamento de dados dos espectros FT -ICR MS .....	81
III.3.2.2.1. Recalibração interna .....	82
III.3.2.2.2. Atribuição das fórmulas moleculares.....	82
IV. RESULTADOS .....	83
IV.1. Coleta de solos e caracterização dos ácidos húmicos .....	84
IV.2. Extração e análise elementar dos ácidos húmicos .....	86
IV.3. Caracterização dos HA usando ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido .....	88
IV.4. Estudos de sorção dos fármacos nos HA .....	92
IV.5. Estudos preliminares e cinéticas de adsorção dos antimicrobianos nos HA extraídos.....	92
IV.5.1. Avaliação da estabilidade do fármaco e efeito matriz do método HPLC- FLD... ..	92
IV.5.2. Avaliação da razão ácido húmico/ solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$ .....	97
IV.5.3. Cinéticas de sorção dos fármacos nos HA (tempo de equilíbrio aparente).....	98
IV.6. Validação do método de quantificação dos analitos por HPLC-DAD-FLD .....	103
IV.7. Isotermas de sorção e dessorção nos HA dos solos avaliados .....	104
IV.8. Efeito do meio de sorção no potencial de sorção e avaliação do mecanismo de sorção .....	109
IV.8.1. Possíveis mecanismos de sorção da ENR nos HA.....	116
IV.9. Coeficientes de sorção $K_D$ : estudo comparativo .....	117
IV.10. Caracterização molecular dos HA extraídos .....	120
IV.10.1. Análise por espectroscopia no infravermelho .....	121
IV.11. Caracterização dos HA mediante espectrometria de massas de alta resolução FT -ICR MS .....	130

IV.11.1.	Preparo da amostra para análise por FT-ICR MS.....	133
IV.11.2.	Espectrometria de massas aplicada a caracterização dos ácidos húmicos	137
IV.11.3.	Diagramas de van Krevelen dos HA .....	141
V.	CONCLUSÕES .....	155
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	157
	ANEXOS.....	183

---

---

## **I. INTRODUÇÃO**

---

---

### **I.1. Antimicrobianos veterinários no ambiente**

O aumento da população mundial leva a uma demanda continuada da produção de alimentos, sendo necessária uma transformação nos sistemas de produção agrícola e pecuária para atender essa demanda. As tendências apontam para um modelo agropecuário intensivo e aumento de escala de produção com vistas à redução dos custos. Com estas mudanças, o uso de medicamentos veterinários passou a ser imprescindível para a manutenção da qualidade dos rebanhos, bem-estar animal e, também para permitir alavancar a produtividade (Cooper et al., 2015; De Briyne et al., 2014; Subbiah et al., 2016).

Esta dinâmica de produção agropecuária estimulou o crescimento do mercado internacional de medicamentos veterinários, que atingiu os 23,9 bilhões de dólares em 2014. No Brasil, esse segmento industrial também está em destaque, sendo que em 2015 movimentou 5 bilhões de reais (SINDAN, 2016).

Estima-se que mais de 70% dos fármacos utilizados na medicina veterinária sejam com finalidade antimicrobiana e que anualmente cerca de 3.500 toneladas de agentes antimicrobianos são utilizadas nos países desenvolvidos (De Briyne et al., 2014).

Os antimicrobianos têm sido empregados com finalidade terapêutica, profilática, metafilática e, em alguns casos, como promotores de crescimento. Essa última finalidade tem sido amplamente discutida e foi banida em alguns países. As espécies alvo que recebem mais antimicrobianos na sua criação para produção de alimentos são as aves, suínos e bovinos (Gonzalez et al., 2017).

Enquanto que na criação de animais de médio e grande porte a medicação pode ser realizada de forma individual, na criação de aves o tratamento de todos os animais confinados é uma prática comum. Já no caso da piscicultura o fármaco é adicionado na ração e lançado diretamente na água. A duração do tratamento pode variar de acordo com sua finalidade, sendo geralmente de menor duração para fins terapêuticos que quando empregados como promotores de crescimento (De Briyne, N., 2014; Ho, et al., 2014).

Uma vez administrados, os antimicrobianos, de modo geral, são pouco absorvidos pelo animal e apenas parcialmente metabolizados. As taxas de excreção dependem da estrutura química do antimicrobiano, do modo de administração, da espécie animal e da dosagem. Como a grande maioria dos antimicrobianos é

hidrossolúvel, frações de até 90% da dose administrada podem ser excretados na urina e nas fezes dos animais tratados (Khan e Ongerth, 2004; Sarmah et al., 2006). Dados da literatura indicam que as taxas de excreção de tetraciclinas e SA podem variar entre 40% e 90% (Kemper, 2008).

Os antimicrobianos veterinários e/ou seus metabólitos podem ser introduzidos no ambiente pela deposição direta, ou seja, pelas fezes e/ou urina dos animais tratados, pelo uso de esterco como fertilizante na agricultura e, no caso da piscicultura e carcinicultura, os mesmos são lançados diretamente na água e podem contaminar tanto a água superficial como o sedimento (Dick et al., 2002; Pico e Andreu, 2007; Sarmah et al., 2006). Cabe destacar, que os metabólitos destes antimicrobianos também podem ser bioativos. De fato, alguns estudos têm demonstrado que em diferentes espécies animais o antimicrobiano enrofloxacin (ENR) da família das FQ é metabolizado à molécula ativa ciprofloxacina (CIP) (Alexy et al., 2004; Celiz et al., 2009; Sarmah et al., 2006).

Em consequência deste cenário, a indústria farmacêutica foi reconhecida como uma nova fonte de contaminantes persistentes e emergentes (Teuber, 2001, De Briyne et al., 2014; Hu et al., 2010), e a preocupação com o destino dos produtos farmacêuticos em matrizes ambientais tem recebido destaque na comunidade científica e órgãos governamentais. As maiores discussões têm sido focadas nos fármacos de origem hormonal (devido ao potencial de interferência endócrina) e os antimicrobianos (podem levar a geração de bactérias resistentes) (Ho et al. 2014a, Gonzalez et al. 2017, Martínez-Carballo et al., 2007; Sukul e Spiteller, 2006).

A quantidade de insumos farmacêuticos ativos e metabólitos bioativos que ingressa no ambiente são da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , mas ainda assim podem promover efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, sendo que a principal preocupação é a ameaça da disseminação de bactérias resistentes no ambiente (Boxall et al., 2006; Cooper et al., 2015; Obimakinde et al., 2017; Sarmah et al., 2006).

No que diz respeito a antimicrobianos, os insumos farmacêuticos ativos com maior número de ocorrências no ambiente são os macrolídeos, as FQ e o grupo das SA. Tetraciclinas e penicilinas foram encontradas apenas em alguns casos e, geralmente, em baixas concentrações (Du et al., 2012; Suzuki e Hoa, 2012; Van Boeckel et al., 2014)

Alguns, estudos relataram a ocorrência de resíduos de FQ em fezes de animais na faixa de concentração de 0,1 a 26 mg kg<sup>-1</sup> (Ho et al., 2014b; Zhao et al., 2010) e em solos agrícolas de 0,2 a 370 µg kg<sup>-1</sup> (Li et al., 2014; Martínez-Carballo et al., 2007; Sturini et al., 2010). Apesar da lipofilicidade das SA, resíduos destes compostos foram encontrados em solos fertilizados com esterco numa concentração na faixa de 20 e 530 µg kg<sup>-1</sup> (Hu et al., 2010; Stoob et al., 2006).

Pesquisas feitas em solos brasileiros sugerem que a ENR é a FQ mais passível de ser encontrada em solos de áreas de produção avícola do Estado de São Paulo. Solos com histórico de aplicação de cama de frango podem conter resíduos de ENR em concentrações de 17 a 27 µg kg<sup>-1</sup> (Leal et al., 2012, Pereira et al., 2012).

O monitoramento dos resíduos de antimicrobianos no ambiente não é realizado com o mesmo empenho que para outras substâncias consideradas de risco. Dados de concentração de antimicrobianos no solo, estrume e águas superficiais, são escassos, principalmente no Brasil, e isso pode estar relacionado, em parte, à dificuldade no desenvolvimento de métodos seletivos e de elevada detectabilidade (na ordem de ng L<sup>-1</sup>) que permitam a quantificação destes contaminantes em matrizes ambientais (Gonzalez Ronquillo e Angeles Hernandez, 2017; Ho et al., 2014a; Santos e Ramos, 2016; van Nuijs et al., 2011).

Deve-se notar que, embora existam diretrizes internacionais para os limites máximos de resíduos de fármacos veterinários nos alimentos (Codex Alimentarius, 2015), não há diretrizes quanto à presença de resíduos de fármacos veterinários, incluindo antimicrobianos, em solos e águas (Watkinson et al., 2009). Em 2001, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) determinou um limite genérico de resíduos de medicamentos veterinários em solos de 100 µg kg<sup>-1</sup>, estabelecido com base em estudos toxicológicos realizados com fármacos veterinários autorizados nos Estados Unidos (EMA, 2008).

#### **I.1.1. Antimicrobianos veterinários no ambiente: resistência bacteriana**

Os resíduos de antimicrobianos nos ambientes aquáticos e terrestres derivados de uso antropogênico, industrial e agrícola, são considerados os principais motores da seleção de bactérias resistentes, sendo que esta pressão na seleção



bacteriana ocorre em um grande espectro de concentração (Bernier e Surette, 2013; Pehrsson et al., 2016). A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo ocorrer entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana. Os antimicrobianos também podem ser absorvidos pelas plantas, interferindo eventualmente em seu crescimento e desenvolvimento, e podendo ser transferidos diretamente aos consumidores pela dieta (Dolliver et al., 2007; Hu et al., 2010).

A resistência antimicrobiana tornou-se uma das maiores ameaças à saúde humana ao nível mundial. Nos EUA, anualmente registram-se 25 mil óbitos decorrentes de infecções provocadas por bactérias resistentes, e em todo o mundo, este número pode chegar a 700 mil (Rushton e Stärk, 2014; Subbiah et al., 2016). As evidências sugerem que, resíduos de antimicrobianos em alimentos e águas, mesmo em concentrações de traços, podem alterar as características de resistência antimicrobiana das bactérias intestinais humanas (Cantas et al., 2013; Founou et al., 2016).

Diversos casos de resistência bacteriana têm sido relatados em ambientes clínicos no mundo todo. Os antimicrobianos carbapenêmicos não são eficazes em mais da metade de pacientes acometidos com infecções provocadas por *K. pneumoniae* (Kumarasamy et al., 2010) e a resistência de *Escherichia coli* às FQ é generalizada (Hopkins et al., 2005). Na Austrália, Áustria, Canadá, Eslovênia, França, Japão, Noruega, Suécia e Reino Unido foram confirmados casos de resistência ao tratamento da gonorreia com cefalosporinas de terceira geração (Tapsall, 2009) e, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO, do inglês *World Health Organization*), em 2014, foram notificados 480.000 novos casos de tuberculoses multirresistente (Shakoor et al., 2016).

São inúmeras as vias de disseminação local e global da resistência antimicrobiana e, ainda, há grandes lacunas de conhecimento quanto a esses processos de disseminação (Howard et al., 2013).

O potencial risco ambiental dos antimicrobianos têm motivado diversas ações em nível mundial. A OMS trabalha em estreita colaboração com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO- *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE - *World Organization for Animal Health*) em uma campanha para

promover o respeito às boas práticas agrícolas e agropecuárias, a fim de prevenir a propagação de resistência antimicrobiana.

Assim mesmo, na 68ª Assembleia Mundial da Saúde ocorrida em 2015, os estados membro se comprometeram a estabelecer um plano de ação global adaptado ao contexto local, que permita a mobilização de recursos humanos e financeiros para implementar possíveis estratégias de mitigação de riscos. Em 2016 a Assembleia Geral das Nações Unidas (ONU) focou sua atenção na temática da resistência antimicrobiana a fim de acelerar os compromissos mundiais e reforçar os esforços multi-setoriais. Este último vem recebendo grande destaque na OMS nos últimos anos e, em 2016 foi lançado um alerta mundial com o qual todos os países deverão participar com ações de grande, médio e pequeno porte com objetivo de minimizar os efeitos da resistência aos antimicrobianos.

Como resultado das exigências mundiais, no Brasil foi lançado o “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (CIPAN)”, que está respaldado pela Portaria 854 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2016 e a Portaria 2775 (2016) do Ministério de Saúde. Este plano é a primeira ação desenvolvida no país que trata da problemática ambiental dos fármacos veterinários.

## **I.2. Transporte dos antimicrobianos no ambiente natural**

O impacto de antimicrobianos veterinários no ambiente é dependente de vários fatores, como a dosagem (quantidade, frequência e duração), a taxa de excreção do composto original e os metabólitos, a capacidade de sorção no solo e a possível degradação durante o tratamento de efluentes (Du and Liu, 2012; Rushton e Stärk, 2014).

Atentando-se ao risco ambiental que os fármacos veterinários representam, a União Europeia já estabeleceu planos de vigilância para regulá-los de forma que os efeitos ambientais sejam minimizados. Assim, as empresas que pretendem comercializar medicamentos de uso veterinário, no ato do registro devem apresentar, além da comprovação da qualidade, segurança e eficácia do produto, uma avaliação do impacto ambiental que inclui a estimativa das concentrações que serão introduzidas nos compartimentos ambientais, com base nas estimativas totais de cinco anos de produção. No Brasil na Instrução Normativa Nº 26, de 9 de julho de

2009 (Instrução do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) se ditam as normas complementares para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego dos produtos antimicrobianos de uso veterinário. Nesta normativa é exigido um relatório de estudos complementares que compreendam a dissipação e degradação das substâncias alvo no solo e na água.

A EMA estabeleceu os parâmetros a serem considerados na avaliação do impacto ambiental de medicamentos veterinários, os quais são baseados nas recomendações da Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (VICH). Esses parâmetros compreendem informações sobre: 1) as propriedades físico-químicas dos fármacos; 2) a ocorrência e comportamento dos fármacos no meio que incluem estudos de sorção em solo, degradação, excreção do fármaco e a 3) toxicidade desses fármacos nos meios aquático e terrestre.

A mobilidade (sorção) dos fármacos veterinários no solo é uma das ações a serem aplicadas para a avaliação do risco ambiental de contaminantes emergentes. A partir desta avaliação é possível antecipar o destino ambiental e identificar cenários de exposição, assim como, obter informações do risco potencial destes contaminantes na população microbiana, humana e no ecossistema.

A sorção no solo se refere a todos os processos passíveis de ocorrerem quando os compostos químicos entram em contato com o solo, incluindo partição, adsorção e absorção.

### **I.2.1. Sorção de fármacos no solo**

O solo é um recurso natural essencial para a sobrevivência dos seres vivos, visto que, nos ecossistemas, contribui para o crescimento das plantas e participa na regulação do fluxo de água no ambiente, funcionando como um tampão ambiental, na formação, atenuação e degradação de compostos naturais. Este é caracterizado por apresentar horizontes, ou camadas diferenciadas como resultado de transformações de energia e matéria e pela habilidade de suportar plantas enraizadas em um ambiente natural (Nieder e Benbi, 2008).

Os solos são constituídos de quatro componentes principais: material mineral, matéria orgânica, ar e água. O ar e a água ocupam os espaços porosos nos solos.

A matéria orgânica do solo (SOM, *soil organic matter*) é resultante, principalmente, da deposição de resíduos de plantas e animais em vários estágios de decomposição. O material orgânico vivo do solo é representado pelas raízes das plantas, animais e biomassa microbiana do solo, onde os resíduos vegetais contêm 60-90% de umidade. A matéria orgânica morta do solo é formada pela decomposição química e biológica de resíduos orgânicos (Nieder e Benbi, 2008).

A SOM denominada de matéria morta pode ser sub-classificada: em material inalterado (em que a morfologia do material original ainda existe), tais como carboidratos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, gorduras, ceras e ácidos orgânicos de baixa massa molar, e em material transformado também chamado de substâncias húmicas (HS) (MacCarthy et al., 2001).

A fração mineral do solo pode ser separada em três partes, as quais são classificadas de acordo com o tamanho das partículas constituintes (argila < 0,002 mm, silte entre 0,002 e 0,05 mm e areia > 0,05 mm).

As frações de areia e silte são constituídas principalmente de minerais resistentes ao intemperismo, como quartzo, além de outros minerais primários em quantidades variáveis como feldspatos e micas. Os argilominerais são silicatos de alumínio, ferro e magnésio hidratados, com estruturas cristalinas em camadas (filossilicatos) compostas por folhas octaédricas e tetraédricas. A folha tetraédrica consiste de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  arranjados de tal maneira que três oxigênios de cada tetraedro são compartilhados com o silício de três tetraedros vizinhos, resultando em um anel hexagonal de tetraedros. Já a folha octaédrica consiste de seis hidroxilas, em dois planos, em coordenação octaédrica com um cátion central divalente ou trivalente. As argilas são geralmente agrupadas segundo os argilominerais que predominam em sua constituição e os mais importantes são a caulinita, a illita e a montmorilonita (Parfitt et al., 1995).

A fração argila do solo normalmente possui carga líquida negativa e, pelo tamanho reduzido e elevada área superficial, representa, juntamente com a matéria orgânica, a fração do solo responsável pelo fenômeno de troca de cátions.

Os minerais da fração argila podem ser divididos em dois grupos. Um com cargas negativas permanentes como esmectitas (montmorilonita), vermiculita e minerais com grupamentos hidroxila e, outro com cargas negativas e positivas dependentes de pH como a caulinita, hematita e gibbsita (Costa et al 2004).

Geralmente a montmorilonita tem maior capacidade de troca catiônica do que a caulinita. Na montmorillonita, 95% das cargas são permanentes e os 5% restantes corresponde a cargas variáveis. A caulinita possui 95% de carga variável, e só 5% das cargas são permanentes (Wu et al., 2013a). Assim, os solos em que a caulinita é a argila predominante, como, por exemplo, nos Latossolos brasileiros, se tem uma baixa capacidade de troca de cátions (Costa et al., 2004, Marques 2011).

#### **I.2.1.1. Estudos de sorção de antimicrobianos veterinários no solo**

A sorção dos antimicrobianos no solo promove a criação de reservatórios de antimicrobianos, limitando sua biodisponibilidade, protegendo também da degradação biótica e abiótica que dificulta os processos de remediação (Boxall et al., 2006; Suzuki et al., 2015).

A extensão da sorção dos antimicrobianos nos solos pode ser influenciada pelas condições climáticas, composição do solo, entre outros fatores ambientais. Contudo, as propriedades físico-químicas do solo, incluindo o teor de matéria orgânica, o tipo e a quantidade de conteúdo de argila, a capacidade de troca de íons e o pH, influenciam fortemente a sorção dos antimicrobianos no solo (Christl et al., 2012; Chen et al., 2013; Tan et al., 2015; ter Laak et al., 2006; Vasudevan et al., 2009; Zhang et al., 2009).

A distribuição de uma substância entre solo (ou a matéria orgânica do solo) e água é um processo complexo com numerosos fenômenos e mecanismos que dependem da natureza química da substância, das características do solo e de fatores climáticos, mecanismos que não podem ser completamente definidos por um modelo laboratorial simplificado. No entanto, o grau de ligação dos contaminantes às partículas do solo no equilíbrio pode ser mensurado pelo coeficiente de sorção ( $K_D$ ). O  $K_D$  é uma medida da sorção de contaminantes para o solo e é definido como a razão entre a quantidade do analito sorvida por unidade de massa de sólido e a quantidade do analito que permanece em solução em equilíbrio. Este parâmetro é determinado experimentalmente e, para que os valores possam ser comparados, devem ser empregados protocolos padronizados. Segundo a EMEA (do inglês *European Agency for the Evaluation of Medical Products*) estes estudos devem ser conduzidos obedecendo à diretriz conforme as recomendações do Guia 106 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD,

*Organization for Economic Co-operation and Development*). Este modelo proposto pelo Guia é capaz de fornecer informações valiosas sobre a relevância ambiental de sorção de uma substância (OECD 106, 2000).

O Guia da OECD 106 propõe uma avaliação da sorção e dessorção de compostos em solos baseado nas isotermas de sorção. A construção das isotermas permite descrever, por exemplo, o tipo de sorção envolvido (linear ou não linear), sua dependência com o tempo (instantânea ou por um tempo considerável), ou a reversibilidade do processo de sorção (reversível ou não-reversível).

Várias equipes de pesquisa no mundo realizaram a avaliação das isotermas de sorção de antimicrobianos em diversos tipos de solos seguindo as diretrizes do Guia OECD 106. Tem sido reportado valores de coeficientes de sorção em solo para FQ na faixa entre 70 e 353.000 L kg<sup>-1</sup> e para as SA valores de K<sub>D</sub> entre 0.23-3.91 L kg<sup>-1</sup>. Valores de K<sub>D</sub> > 5 L kg<sup>-1</sup> sugerem que as substâncias têm alto particionamento, baixa mobilidade, elevada afinidade com o solo e acumulação, principalmente na camada superficial do solo (Boxall et al., 2002; Carrasquillo et al., 2008; Conkle et al., 2010; Gu e Karthikeyan, 2005; Peruchi et al., 2015, Teixidó et al., 2014; Vieira e Fostier, 2016; Vieira et al., 2017; Wegst-Uhrich et al., 2014;).

É importante destacar que a maioria dos estudos publicados sobre sorção e dessorção de fármacos veterinários em solos foram realizados em climas temperados do hemisfério norte (Conkle et al., 2010; Gu e Karthikeyan, 2005). Apesar do expressivo uso destes insumos farmacêuticos ativos no Brasil, são poucas as pesquisas na área. O trabalho de Michael Spiteller et al (1997) relata a grande afinidade de antimicrobianos veterinários nos solos brasileiros quando comparado com outros solos de diferentes origens geográficas. Os resultados de estudos que avaliaram a sorção de antimicrobianos em solos coletados em algumas regiões brasileiras provenientes de Leal et al. (2013), Peruchi et al. (2015) e Vieira e Fostier (2016) demonstram grande afinidade das FQ pelos solos brasileiros.

Presume-se que as diferentes condições climáticas e os diferentes tipos de solos de regiões tropicais como Brasil, devem contribuir para que esses compostos tenham comportamentos ambientais diferentes em relação aos solos de clima temperado (Boxall et al., 2002; Doretto et al., 2014; Stoob et al., 2006; Vancampenhout et al., 2009). Por essas diferenças justifica-se a importância da realização de estudos de mobilidade de fármacos veterinários antimicrobianos em solos característicos do Brasil, assim como levantamentos sobre seus possíveis

efeitos sobre o ecossistema e estudos a respeito da dinâmica desses compostos em solos brasileiros.

Os estudos realizados no nosso laboratório nos últimos seis anos, como parte da vertente de poluentes emergentes do projeto temático da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) intitulado “Fármacos veterinários no ambiente”, permitiram a comparação da capacidade de sorção de diversos fármacos veterinários antimicrobianos incluindo fármacos da família das tetraciclínas, avermectinas, macrolídeos, sulfonamidas (SA) e fluoroquinolonas (FQ) em quatro solos característicos do Estado de São Paulo.

Na compilação dos resultados obtidos, mediante o projeto temático, chamou a atenção especificamente à alta capacidade de sorção das FQ, apresentando altas constantes de sorção ( $K_F$ ) calculadas entre 2468 e 268  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$  (Peruchi et al., 2015; Vieira e Fostier, 2016), indicando elevada afinidade do composto pelas partículas do solo, quando comparada com a capacidade de sorção de fármacos veterinários de outras classes (de Oliveira Neto et al., 2017; Pereira et al., 2012). Em contraste, um baixo potencial de sorção foi atribuído para a sorção de SA ( $K_F$  entre 0,45 a 19,0  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ , sendo que estes resultados foram obtidos a partir de estudos realizados nos mesmos solos) (Doretto e Rath, 2013; Doretto et al., 2014; Vieira et al., 2017).

Embora os resultados indiquem uma forte tendência de sorção de FQ em solos quando comparados com as SA, pouca informação se tem sobre o mecanismo de interação destes compostos com os diferentes componentes do solo: material mineral e matéria orgânica.

### **1.2.2. Fármacos veterinários da família das fluorquinolonas e sulfonamidas**

Como exposto anteriormente, a capacidade de sorção dos antimicrobianos no solo e, portanto, seu mecanismo de sorção é fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas do composto e do tipo de solo. A seguir serão apresentadas as características físico-químicas dos antimicrobianos FQ e SA, sendo estes compostos as moléculas moldes escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho.

As FQ são derivados das quinolonas, cuja modificação estrutural levou a um aumento no espectro de atividade antimicrobiana e a uma melhoria nas propriedades farmacocinéticas (Andersson e MacGowan, 2003). As FQ de maior uso veterinário no Brasil são a enrofloxacin (ENR) com 72 formulações cadastradas no Compêndio de Produtos Veterinários (CPVS) do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), seguida da norfloxacin (NOR) com 14 formulações cadastradas, a ciprofloxacina (CIP) e a danofloxacin com sete e duas formulações, respectivamente.

As SA são antimicrobianos sintéticos e importantes agentes bacteriostáticos. No Brasil, as SA de maior uso na medicina veterinária são: sulfadiazina (sete formulações), sulfametazina (16 formulações), e sulfaquinoxalina (SQX) com oito formulações (SINDAN, 2017).

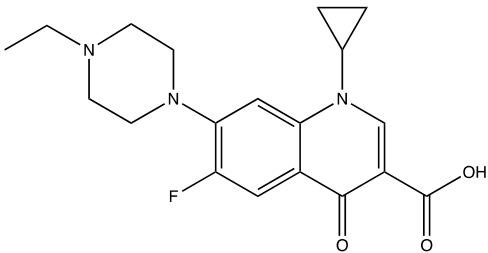
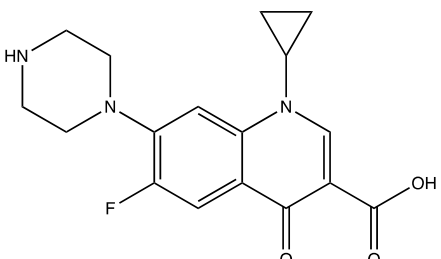
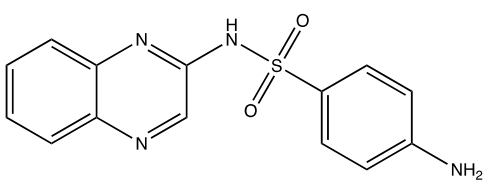
Os antimicrobianos objetos desta tese são a ENR, CIP e SQX. As propriedades físico-químicas destes antimicrobianos estão apresentadas no **Quadro 1**.

As FQ apresentam dois grupos funcionais ionizáveis: um grupo carboxila e um grupo amina. Por tanto, as FQ em solução podem existir nas formas catiônicas, zwitteriônicas e aniônicas, dependendo do pH da solução. Vale lembrar que em  $\text{pH} < 4,5$  ( $\text{pH}$  dos solos tropicais), a forma catiônica da ENR é predominante, devido à protonação da amina do grupo piperazinil.

A SQX tem constantes de dissociação ácida na faixa de  $\text{pH}$  de 2 a 6. Por conseguinte, as espécies aniônica e catiônica são assumidas como não-contribuintes para o processo global de sorção (considerando o  $\text{pH}$  natural dos solos tropicais com valores entre 4 e 5) e a sorção pode ser atribuída majoritariamente à interação da fração neutra com os sítios ativos do solo (Bialk et al., 2005; Doretto et al., 2014). Portanto, o coeficiente de partição octanol-água deve ser considerado na avaliação de risco ambiental destes compostos. A lipofilicidade das SA está relacionada com as cadeias laterais dos grupos sulfonilo e aminas. A SQX é uma SA com alto coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow} = 47,9$ ) e, portanto, foi escolhida como molécula modelo do grupo das SA para este trabalho.



**Quadro 1**– Propriedades físico-químicas dos antimicrobianos avaliados.

Estruturas	Propriedades físico-químicas*
<p style="text-align: center;"><b>ENROFLOXACINA</b></p> 	
<p style="text-align: center;"><b>CIPROFLOXACINA</b></p> 	
<p style="text-align: center;"><b>SULFAQUINOXALINA</b></p> 	

\*Calculados usando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (1994-2013 ACD/Labs).

### I.2.3. Elucidação dos mecanismos de sorção de FQ e SA no solo

Pesquisas que permitam a compreensão do mecanismo de sorção dos antimicrobianos veterinários no solo, ainda são escassas, quando comparado ao conhecimento do comportamento de sorção de outros contaminantes orgânicos de uso intenso, como, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Salloum et al., 2002) ou herbicidas da família das triazinas (Kulikova e Perminova, 2002).

Porém, já foram realizados alguns estudos que avaliam o mecanismo de sorção de alguns fármacos veterinários, como tetraciclina e macrolídeos no solo (Pils e Laird, 2007; ter Laak et al., 2006).

Estudar o mecanismo que governa o processo de sorção de antimicrobianos no solo não é uma tarefa fácil, já que o solo é um sistema complexo de componentes orgânicos e inorgânicos. A fim de simplificar esta tarefa, diversos modelos têm sido desenvolvidos na literatura avaliando de forma individual a interação dos antimicrobianos com os componentes isolados do solo, tais como, os minerais de argila, óxidos hidratados e a matéria orgânica solo (Gu e Karthikeyan, 2005; Yan et al., 2013).

A contribuição dos minerais argilosos nos processos de sorção das FQ no solo já foi amplamente estudada. Foi observado que a sorção de FQ sobre caulinita e montmorilonita se deve a troca de cátions (MacKay e Seremet, 2008; Pei et al., 2010; Tan et al., 2015), sendo este um processo dependente do pH do meio (Wu et al., 2013b).

No entanto, a pesquisa de Chen et al (2013) e Carrasquillo et al (2008) apontaram que a interação por complexação também é relevante. Os autores observaram que o aumento da concentração de cátions sorvidos na superfície da argila diminui a mobilidade das FQ. Pei et al. (2010) avaliaram também o papel dos locais de carga da argila na sorção de FQ, sugerindo que as FQ podem ser sorvidas em montmorilonita mediante interações de troca catiônica entre o átomo N heterocíclico protonado da FQ e a carga permanente da argila do solo a valores de  $\text{pH} < 7.0$ . A valores de  $\text{pH} > 7$  foi evidenciada uma maior sorção de FQ em caulinita (argila de baixa capacidade de troca catiônica) quando comparada com montmorillonita, indicando possível interação entre o grupo carboxilo da CIP e os locais de carga variável na caulinita mediada pela formação de complexos metálicos (Chen et al., 2013, Tan et al., 2015).

Diversos estudos na literatura indicam uma mínima capacidade de sorção de SA no material inorgânico do solo. No entanto, as fases inorgânicas podem controlar a sorção de SA em solos e sedimentos com baixos teores de carbono orgânico. Os óxidos de ferro podem contribuir na sorção de SA, uma vez que podem atuar como potenciais sorventes de compostos aniônicos. Também os autores ressaltam a importância de avaliar a contribuição e o mecanismo de sorção

das associações de matéria inorgânica e orgânica que ocorrem naturalmente (Gao e Pedersen, 2005; Kahle e Stamm, 2007b).

Embora os minerais de argila possam contribuir para a sorção de FQ e SA no solo, a matéria orgânica do solo (SOM) desempenha um papel fundamental no processo (Zhang et al., 2009). A maior parte dos estudos publicados, buscam correlacionar características gerais da SOM, tais como a polaridade ou aromaticidade com a capacidade de sorção (Clark Ehlers et al., 2010; Rai et al., 2014).

Teixidó et al. (2014) reportaram que a matéria orgânica do solo aumenta a sorção das FQ no solo. Os resultados indicam que o comportamento de sorção das FQ é fortemente dependente do pH e do número de sítios com carga negativa (grupos carboxílicos) da matéria orgânica (Zhang et al., 2012). No entanto, outras interações como ponte catiônica (*cation-bridging*) também podem ser relevantes, especialmente quando a troca catiônica é impedida pela presença concomitante de cátions que podem competir pelos sítios de troca (Aristilde e Sposito, 2010, 2013; Carmosini and Lee, 2009). Assim mesmo, uma abordagem que envolve modelagem molecular foi reportada por Aristilde e Sposito (2010), em que os autores propõem que a interação das FQ com a SOM é facilitada e mediada pela interação de um hidrogênio do grupo carboxila das HS da SOM e um grupo amino protonado da FQ ou entre um grupo carboxilato da FQ e grupos fenólicos (grupo OH) das HS.

Estudos que avaliam a capacidade de sorção indicam uma fraca associação das SA com o solo. No entanto, existem relatos de ocorrência de resíduos das SA em solos indicando que estes fármacos não são prontamente biodegradados e que podem persistir no solo. Alguns autores sugerem que as SA formam resíduos não extraíveis no solo, devido a fortes interações com às macromoléculas da SOM (Ahmed et al., 2016; Bialk et al., 2005; Gao e Pedersen, 2010; Ho et al., 2014a; Lian et al., 2015; Schwarz et al., 2012).

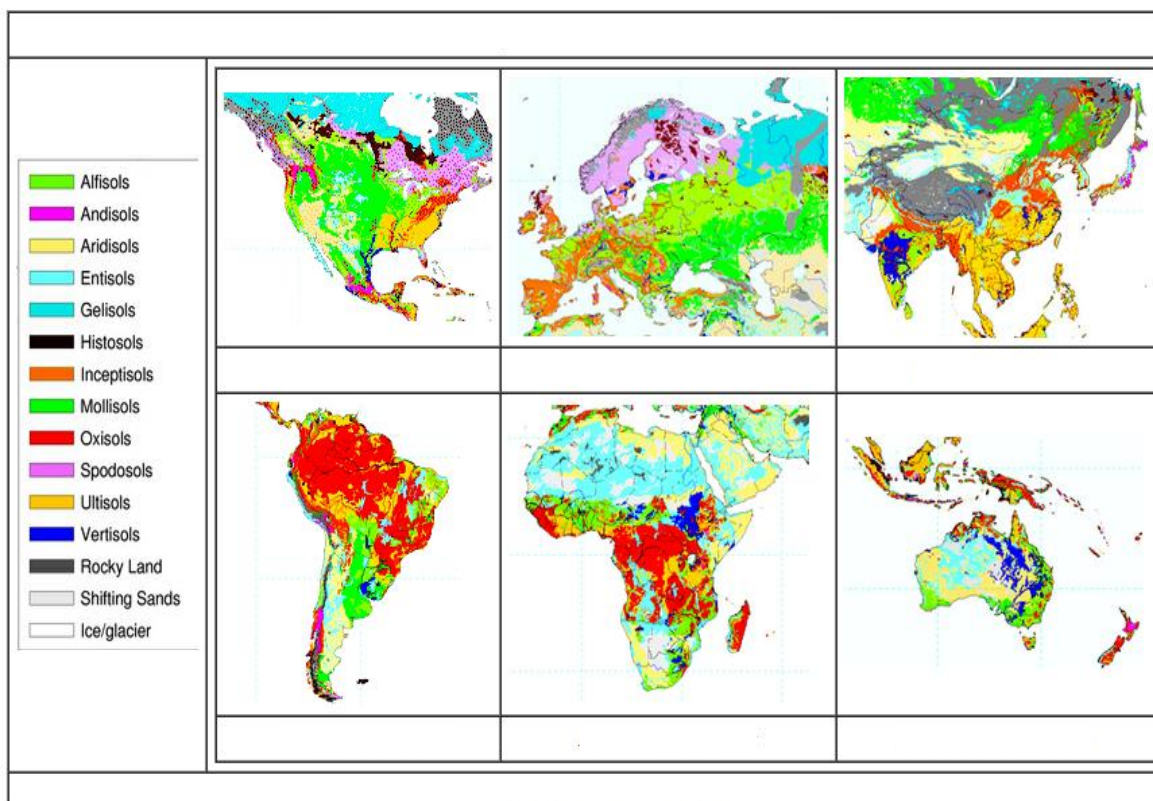
O trabalho de modelagem molecular de Ahmed et al. (2016) sugere que as SA têm elevada afinidade de sorção na matéria orgânica rica em grupos funcionais contendo oxigênio quando comparados com compostos com abundantes grupos contendo nitrogênio. As SA interagem mais fortemente com N-heterocíclicos do que com aromáticos substituídos, e se ligam a compostos aromáticos policíclicos mais fortemente do que a monocíclicos.

Contudo, há poucos estudos descritos na literatura que tratam sobre os mecanismos de sorção de contaminantes emergentes, como os antimicrobianos veterinários da família das FQ e SA na matéria orgânica do solo (Tan et al., 2015). A compreensão dos mecanismos envolvidos na sorção de FQ e SA em solos ao nível molecular ainda é um desafio, em parte, devido à natureza heterogênea da SOM tornando difícil relacionar o nível molecular com o macroscópico (Ahmed et al., 2016). Poucos estudos têm sido realizados no intuito de investigar a influência da heterogeneidade estrutural dos componentes da matéria orgânica. Ainda, a geração de dados experimentais é necessária para a criação de modelos preditivos do destino dos antimicrobianos no solo (Ahmed et al., 2016).

### **I.3. Características dos solos brasileiros**

De acordo com o atual Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS, Embrapa, 2006), 13 grandes classes de solos são representativas das paisagens brasileiras. Os Latossolos, Argilossolos e Neossolos são os solos mais abundantes, com uma distribuição relativa de 38,73%, 19,98% e 14,57%, respectivamente (Manzatto et al., 2002)).

Os Latossolos, em particular, são predominantes nas regiões dos trópicos, sendo que 45% destes solos estão localizados na América do Sul, com incidência limitada na Ásia e nos Estados Unidos (**Figura 1**). No Brasil, os Latossolos cobrem 56,3% da área na região sudeste, incluindo os solos denominados de Latossolos com horizonte húmico. Estes solos possuem características peculiares, sendo intensamente intemperizados e baixa capacidade de troca catiônica (Calegari et al., 2013; Marques et al., 2011).



**Figura 1** – Distribuição dos solos no mundo. Adaptada da *FAO-UNESCO Soil Map of the World using the USDA soil taxonomy*. Os solos na região vermelha correspondem a Latossolos (Oxisols), em magenta espodosolos (Entisols) e amarelo Argissolos (Ultisols).

Em comparação com os solos das regiões temperadas do hemisfério norte, os solos brasileiros são altamente intemperizados e ricos em minerais de argila 1:1, como caulinita, e em óxidos e hidróxidos de Fe e de Al (hematita e gibbsita). Estes solos tem predominância de cargas positivas sobre as negativas, e consequentemente, a retenção de ânions (sulfatos, fosfatos) é maior do que a de cátions. Essas características resultam em solos com menor capacidade de troca catiônica (CTC) que solos de clima temperado (Liang et al., 2006a).

Considerando que a prevalência de mecanismo de sorção de FQ em solos deve ser de troca catiônica (conforme descrito anteriormente), é muito provável que a capacidade de retenção destes compostos, assim como das SA, nos solos brasileiros dependa inteiramente do teor de matéria orgânica dos mesmos.

Por tanto, um estudo específico da SOM dos solos brasileiros é de fundamental importância para compreender os processos de sorção e dissipação de

fármacos veterinários e outros contaminantes em áreas tropicais e subtropicais do continente sul-americano.

#### **I.4. Matéria orgânica do solo e substâncias húmicas**

Estima-se que 80 a 90% da SOM é constituída por HS, as quais são consideradas como as principais responsáveis no transporte e transformação de compostos químicos no solo (Sutton e Sposito, 2005).

As HS são definidas pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, *International Humic Substances Society*) como misturas complexas e heterogêneas de materiais polidispersos formados por reações bioquímicas e químicas durante a decomposição e transformação de vegetais e microrganismos, sendo este processo chamado de humificação (IHSS, 2014). Assim, a heterogeneidade molecular inerente das HS, as torna um material altamente refratário, o que as confere um papel chave no sistema ecológico.

As HS podem ser classificadas em três frações, dependendo de sua solubilidade em condições ácidas ou alcalinas. As huminas, ou fração insolúvel das HS em qualquer condição de pH, também conhecida como fração inerte. Os ácidos húmicos (HA), fração solúvel em condições alcalinas e insolúvel em condições ácidas (pH geralmente < 2); e os ácidos fúlvicos (FA), fração solúvel tanto em condições ácidas como básicas (IHSS, 2014).

Os HA são de importância ambiental, considerando que estes são capazes de quelar metais, bem como interagir com contaminantes orgânicos hidrofóbicos (Simpson et al., 2003; Zhang et al., 2009). Os HA e FA têm influência direta nas reações de troca catiônica no solo, uma vez que podem adquirir cargas negativas devido à presença de grupos polifenólicos e carboxílicos em sua estrutura. Outros tipos de interações como ligações de hidrogênio, interação hidrofóbica entre grupamentos alifáticos, transferência de carga e sobreposição de sistemas  $\pi$  aromáticos são também observados entre os HA e compostos orgânicos (Celano et al., 2008;).

Os HA também são considerados potenciais candidatos para processos de remediação envolvendo contaminantes inorgânicos e orgânicos em meios aquosos. O papel na biorremediação ainda não está bem estabelecido, entretanto diversas publicações relatam sua aplicação em poluentes aromáticos ou

halogenados (Anđelković et al., 2004; Baidoo et al., 2014; Čežíková et al., 2001; Kuráň et al., 2014; Poerschmann et al., 2008; Ritchie e Perdue, 2003; Salati et al., 2011; Zeledón-Toruño et al., 2007). Os HA têm sido escolhidos para a avaliação da reatividade da matéria orgânica humificada, no ambiente, a qual depende da qualidade e quantidade de grupos funcionais presentes em sua estrutura.

A maior parte dos estudos com SA e FQ em HS está limitada a experimentos com o padrão de HS fornecido pelo IHSS e uma menor parte envolvendo experimentos com HS extraídos de solos (Baidoo et al., 2014; Gu et al., 2007; Ritchie e Perdue, 2003). Até o presente poucos estudos têm sido realizados para investigar a influência da heterogeneidade estrutural dos HA na sorção das FQ e SA no solo (Khan e Ongerth, 2004) e nenhuma informação se tem referente à dinâmica destes contaminantes nos HA de solos Brasileiros.

Para avaliar a composição estrutural dos HA e o impacto na capacidade de sorção de contaminantes no solo, se faz necessário caracterizar os grupos funcionais orgânicos presentes na fração da matéria orgânica, a fim do reconhecimento de relações entre o comportamento destes contaminantes e as variações das estruturas das moléculas.

#### **I.4.1. Caracterização molecular dos ácidos húmicos do solo**

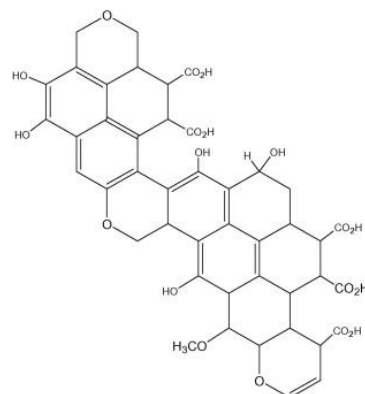
A proposta de uma estrutura básica dos HA tem sido objeto de inúmeros trabalhos. Em 1916, Maillard postulou que os HA eram produtos da reação de açúcares redutores e aminoácidos (2008; Hedges et al., 2000).

Kononova e Scheffer (Kononova, 1963; Scheffer, 1962) definiram os HA como um sistema polimérico, baseado na observação da composição elementar, propriedades ópticas e eletroforéticas. Experimentos que suportam essa teoria foram oriundos da pesquisa de Cameron et al. (1972), cujos dados sugerem que as moléculas de HA têm massa molar ponderada média entre 20.000 a 50.000 Da (Sutton e Sposito, 2005).

Em 1921, Fischer e Schrader postularam uma nova teoria na qual se preconizava que os HA seriam formados essencialmente por ligninas parcialmente modificadas. Nesta teoria os aldeídos e ácidos fenólicos, originados a partir da degradação parcial da lignina, podem sofrer recombinações entre si ou com outras moléculas orgânicas convertendo-se em quinonas, que mediante reações de

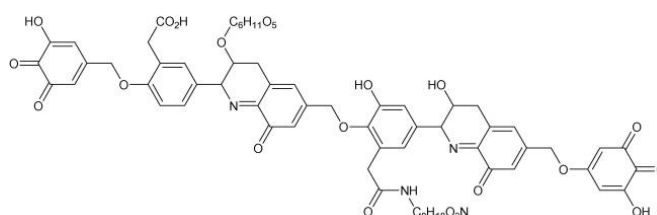
condensação com a amônia e outros compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, dão origem a os HA.

A partir da definição polimérica dos HÁ, diversas estruturas foram propostas. Uma das estruturas mais populares foi postulada por Fuchs (1931) e apresentada na **Figura 2** que descreve os HA como um sistema complexo contendo anéis condensados com substituintes COOH e OH (Jansen et al., 1996).



**Figura 2** – Modelo de ácido húmico proposto por Fuchs. Adaptado de Jansen et al. (1996).

Já no modelo de estrutura proposto por Dragunov (1948) e Flaig (1964) os HA são formados por anéis aromáticos menos condensados dos tipos di- e tri-hidroxibenzeno e grupos quinona interligados por grupos  $-\text{CH}_2\text{O}-$  e  $-\text{CN}$ . Nesta estrutura também são incluídos carboidratos e peptídeos (**Figura 3**).

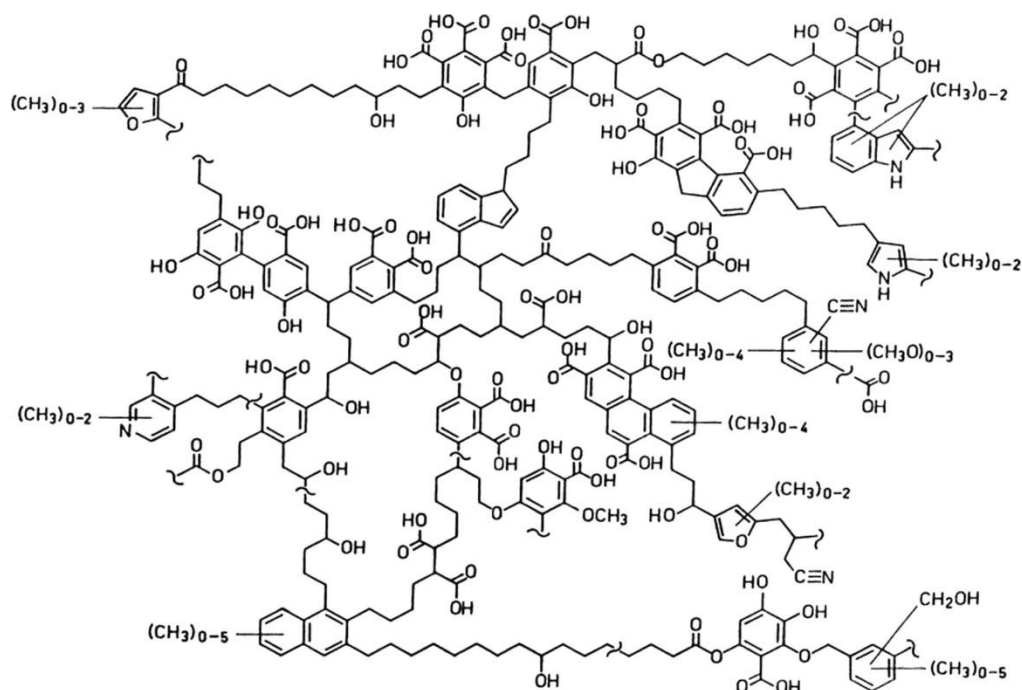


**Figura 3** – Modelo de HA proposto por Dragunov. Adaptado de Al-Faiyz (2013).

Um avanço significativo na definição estrutural dos HA foram os modelos postulados por Kleinhempel (1970), Stevenson (1982) e Schulten e Schnitzer (1995). Os autores apresentaram uma nova concepção de modelo estrutural para a estrutura dos HA. Neste modelo os HA são considerados altamente aromáticos com



alto grau de substituição, contendo uma série de grupos fenólicos e carboxílicos, que são principalmente ligados a anéis aromáticos. Este modelo inclui na estrutura do HA compostos de lignina oxidada, um complexo fenol-aminoácido, uma hidroxilquinona e uma unidade estrutural C6-C3 de lignina e um número significativo de porções alifáticas (**Figura 4**). No entanto, nenhuma das estruturas químicas propostas encontrou ampla aceitação (MacCarthy, 2001; Schaumann, 2006).



**Figura 4** – Modelo estrutural de HA proposto por Schulten e Schnitzer. Adaptado de Schulten e Schnitzer (1995).

Com o avanço das técnicas instrumentais, surgiu um progresso considerável na elucidação da composição química das HS. Piccolo (2002) aplicou o conceito da química supramolecular e com evidências cromatográficas (Piccolo et al., 1996) e espectrométricas (Piccolo e Spiteller, 2003; Simpson et al., 2002), postulou uma nova concepção para a estrutura das HS. Foi proposto que diversas moléculas orgânicas presentes no solo, de tamanho relativamente pequeno, são capazes de formar agregados, mediante ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, formando um arranjo supramolecular. Esse arranjo apresenta massa molecular aparentemente elevada, mas que pode ser continuamente alterada de acordo com as variações nas condições do meio. Este novo conceito incentivou

novas pesquisas baseadas no emprego de técnicas de análise instrumental que permitissem a caracterização destas substâncias.

Atualmente, as HS são definidas como um complexo supramolecular constituído de um grupo de moléculas heterogêneas relativamente pequenas na faixa de massa de 100–2000 Da.

De acordo com esse modelo, os FA seriam formados por pequenas micelas estáveis que permaneceriam dispersas pela repulsão das cargas negativas originadas da dissociação da grande quantidade de grupos ácidos presentes na sua estrutura. As micelas de HA, por outro lado, por apresentarem uma menor quantidade de grupos funcionais ácidos, poderiam aproximar-se o suficiente para formar agregados de elevada massa molecular (Hayes e Clapp, 2001). Esta agregação de constituintes húmicos leva à formação de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, os quais podem resultar em interações complexas com contaminantes orgânicos. Cabe ressaltar que os HA são formados *in situ* por reações bioquímicas e químicas durante a decomposição e transformação de vegetais e microrganismos, fornecendo variabilidade na sua composição relativa (Trevisan et al., 2010).

Dada à elevada heterogeneidade e complexidade estrutural dos HA a caracterização estrutural deve ser abordada mediante uma combinação de métodos analíticos. Até recentemente, estes métodos analíticos estavam restritos à descrição de propriedades gerais ou à caracterização em detalhe de pequenas frações da matéria orgânica. A primeira categoria (descrição de propriedades gerais) inclui análises como a medida do teor de carbono orgânico dissolvido, análise elementar de C, H, O, N e S, composição isotópica média, análise por espectroscopia de fluorescência, espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS), infravermelho (IR, *infrared spectroscopy*) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*). A segunda categoria (caracterização em detalhe de pequenas frações da SOM) inclui análises muitas vezes assistidas por técnicas de separação, como a cromatografia líquida ou gasosa. Com estas técnicas podem ser separadas ligninas, aminoácidos, ácidos nucléicos e outras biomoléculas. Embora essas abordagens têm produzido avanços significativos, essas ainda são fundamentalmente limitadas.

Recentemente, a espectrometria de massas de ultra-alta resolução de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) tem sido aplicada na

caracterização da composição molecular de misturas complexas, tais como a SOM (Kujawinski et al., 2001).

A caracterização da matéria orgânica de solos Brasileiros é escassa, a maioria dos resultados publicados está baseada nos resultados obtidos mediante técnicas analíticas instrumentais, tais como análise elementar, espectroscopia UV-VIS, IR, NMR, fluorescência e pirólise acoplada a cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (py-GC-MS). A aplicação de técnicas de espectrometria de massas de alta resolução na caracterização de SOM do Brasil ainda é restrita. Na literatura foram encontradas apenas duas publicações que incluem a análise de amostras de solos Brasileiros, da região de Cananeia e São Paulo por espectrometria de massas de alta resolução para a caracterização molecular de HA e FA extraídos destes solos. No entanto, as análises foram realizadas na Espanha (Baigorri et al., 2008; Pena-Mendez et al., 2005).

A seguir serão descritas as informações que podem ser obtidas na análise de HA por diferentes técnicas analíticas.

#### **I.4.1.1. Análise do teor de carbono e análise elementar**

A composição elementar reflete as diferentes condições de formação das HS, ou seja, o ambiente pedogenético. Por exemplo, nos primeiros estágios do processo de humificação dos HA ocorre um incremento no teor de nitrogênio acompanhado de uma diminuição no teor de hidrogênio e oxigênio. A diminuição do teor de oxigênio com a humificação é consequência, principalmente, das reações de descarboxilação (Sparks et al., 2008).

As relações atômicas molares entre os elementos componentes das HS são um indicador simples do seu comportamento químico. A relação molar H/C é determinada pela razão entre as quantidades percentuais de cada elemento e suas respectivas massas atômicas. Valores maiores de H/C indicam maior contribuição de componentes alifáticos e/ou maior alifaticidade nas moléculas que compõem o HA, enquanto, menores valores de H/C indicam maior aromaticidade e/ou condensação de anéis aromáticos, ou nível de insaturação. Quanto maior for a razão O/C nos HA, maior é a densidade de grupos funcionais oxigenados, como grupos carboxila e hidroxila (Canellas et al., 2001).

#### **I.4.1.2. Técnicas espectroscópicas na região do UV-Vis**

Os espectros UV-Vis dos HA, em geral, apresentam pouca definição e a intensidade de absorção decresce com o aumento do comprimento de onda, fornecendo, de modo geral, pouca informação estrutural. Os HA geralmente mostram forte absorbância na faixa UV-Vis (de 190 a 800 nm), particularmente na região do UV, por causa da presença de cromóforos aromáticos e/ou outros compostos orgânicos. No entanto, pouca radiação é absorvida na região do visível do espectro. Algumas estruturas como quinonas e grupos funcionais como ceto-enol absorvem radiação nesta faixa.

As principais informações que podem ser obtidas por essa técnica analítica são a inferência qualitativa sobre o grau de humificação e/ou tamanho das moléculas e massa molar das substâncias húmicas. Estas informações são obtidas por meio da análise espectral em determinados comprimentos de onda. A absorção em vários comprimentos de onda: 250, 254, 280, 300, 365, 400, 436 e 465 nm, bem como uma relação destes têm sido citados na literatura para a diferenciação espectral de substâncias húmicas (Uyguner e Bekbolet, 2005).

#### **I.4.1.3. Espectroscopia no infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho (IV) tem sido amplamente usada para a caracterização da matéria orgânica. Os modos comumente utilizados para analisar HA são a espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier por reflectância por transmissão (T-FTIR), espectroscopia de infravermelho de refletância difusa por transformada de Fourier, DRIFT (*Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy by Fourier Transform*) e o modo de reflectância total atenuada (ATR – *Attenuated Total Reflectance*) (Tatzber et al., 2007).

De modo geral, os espectros IV de HA apresentam bandas de absorção bem definidas na região do infravermelho médio e são atribuídas a grupos químicos orgânicos funcionais comuns (Salloum et al., 2002; Stenberg et al., 2010; Tivet et al., 2013; Yan et al., 2013).

No entanto, de modo geral, os espectros dos HA apresentam uma baixa resolução dificultando a interpretação dos mesmos (Gonzalez Vila e Lentz, 1976; Wegst-Uhrich et al., 2014). Adicionalmente, podem ser observadas bandas de

absorção decorrentes da presença de minerais e argilas. Em solos brasileiros é comum verificar a presença de bandas em  $1006\text{ cm}^{-1}$ ,  $1092\text{ cm}^{-1}$  e  $3646\text{ cm}^{-1}$  (caolinita). Bandas características em  $1030$  e  $1080\text{ cm}^{-1}$  correspondem a superposição do alongamento de argila e de polissacarídeos (Tivet et al., 2013).

#### I.4.1.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) de CPMAS  $^{13}\text{C}$  (*cross polarization magic angle spinning  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance*) em estado sólido é um dos métodos mais amplamente usados para a caracterização da matéria orgânica em solos de modo geral.

No entanto, existe uma preocupação referente à confiabilidade quantitativa da técnica  $^{13}\text{C}$  CPMAS na análise de HA, uma vez que alguns fatores, intrínsecos a composição da amostra, podem afetar a intensidade do sinal. Por exemplo, os carbonos alifáticos nas proximidades de hidrogênios ganham intensidade mais rapidamente do que carbonos aromáticos, especialmente aqueles em estruturas altamente condensadas. Outro fenômeno é o surgimento de bandas laterais (*spinning sidebands*), uma vez que o CPMAS  $^{13}\text{C}$  não é rápido o suficiente para removê-los completamente, então especialmente para carbonos aromáticos e carboxilo, podem surgir estas bandas laterais, as quais podem ser muito largas e se sobrepor com outros sinais. Como alternativa para contornar estas limitações autores recomendam trabalhar em campos inferiores a 25 MHz para o CPMAS  $^{13}\text{C}$ , o que por outro lado pode comprometer a relação sinal-ruído. Embora, existam desvantagens, muitas informações podem ser abstraídas dos espectros de CPMAS  $^{13}\text{C}$  (Boeni et al., 2014; Courtier-Murias et al., 2014; ŠMejkalová et al., 2008; Zhong et al., 2011).

Os espectros obtidos pela técnica de NMR podem também conter informações sobre mudanças químicas dos HA ocorridas durante o processo de humificação. No processo de humificação ocorre uma diminuição de sinais correspondentes a hidratos de carbono, que são os mais facilmente metabolizáveis e, portanto, se decompõem mais facilmente, seguida da alteração e diminuição dos sinais relativos aos grupos alquilos ( $-\text{CH}_2-$ ) e fenólicos C ( $150 \pm 160\text{ cm}^{-1}$ ), com um concomitante aumento de sinais C aromáticos na região de  $144-93\text{ ppm}$  do espectro (de Carvalho et al., 2014; Dieckow et al., 2005).

#### **I.4.1.5. Espectroscopia de fluorescência**

As técnicas de NMR e IR são consideradas técnicas fundamentais utilizadas para estudar a estrutura e humificação dos HA. No entanto, estas técnicas nem sempre são acessíveis por serem muito complexas e dispendiosas. Nos últimos anos, a espectroscopia de fluorescência tem sido amplamente reconhecida como uma técnica relativamente simples, sensível e útil para o estudo da química estrutural e funcional de amostras ambientais. Os principais componentes da matéria orgânica do solo responsáveis pela fluorescência incluem as substâncias húmicas, os derivados da decomposição do material vegetal, os aminoácidos, proteínas e peptídeos (Chen et al., 2003). Os HA podem apresentar fluorescência devido à presença de várias estruturas intrínsecas, como os anéis aromáticos condensados, e/ou cadeias alifáticas altamente insaturadas. No entanto, a intensidade de fluorescência dos HA é altamente dependente da massa molecular, pH do meio, força iônica, temperatura e potencial redox do meio (Milorí et al., 2002).

Quando comparado com as técnicas de absorção na região do UV, a espectroscopia de fluorescência possui a vantagem de fornecer informação relativa à estrutura, grupos funcionais, bem como propriedades dinâmicas relacionadas a suas interações intra- e intermoleculares (Chen et al., 2003).

Entretanto, a heterogeneidade e complexidade inerente destas misturas faz com que os espectros de fluorescência apresentem grandes deslocamentos e sobreposição de sinais tornando difícil a identificação e interpretação de assinaturas espectrais, a grande informação inerente nos espectros de fluorescência molecular, só pode ser extraída e tratada através de métodos quimiométricos.

#### **I.4.1.6. Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas é um método analítico promissor para a caracterização de substâncias húmicas, uma vez que permite a interpretação estrutural das moléculas que compõem os HA, fornecendo informações a respeito das ligações entre estas moléculas e os espaçamentos entre os vários grupos funcionais. O uso desta técnica permitiu elucidar que os HA têm uma baixa massa nominal média (aproximadamente entre 100 – 2000 Da) (Brown e Rice, 2000;

DiDonato et al., 2016). No entanto, existem diferentes modos de ionização e analisadores de massas, os quais são discutidos a seguir.

#### **I.4.1.7. Métodos de ionização em espectrometria de massas de alta resolução para a caracterização dos ácidos húmicos**

O desenvolvimento de métodos de ionização mais brandos, como a dessorção/ionização por laser (LDI, *Laser Desorption Ionization*), dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption*) e ionização por eletronebulização (ESI, *Electrospray Ionization*), permitiu grandes avanços na aplicação da espectrometria de massas de alta resolução na análise dos HA.

O uso do MALDI para a caracterização dos HA tem sido pouco explorado (Chilom et al., 2008; Remmler et al., 1995) e para solos brasileiros não existem dados reportados na literatura empregando essa técnica de ionização. Embora, a ionização por LDI não é adequada para a caracterização molecular das HS, uma vez que na ionização as espécies de maior massa podem ser fragmentadas e, em consequência, a atribuição da fórmula molecular não corresponderia à molécula original, no entanto, esta técnica de ionização foi usada por Peña-Mendez e colaboradores (2005) para caracterizar HS extraídas de solos de diversas origens, incluindo solos Brasileiros.

A ESI é a técnica de ionização de escolha para análise de HS. Stenson (2002) caracterizou as HS de um padrão do IHSS (Suwannee River, SRFA e SRHA) e conseguiu confirmar que praticamente todos os íons registrados no espectro de massas são monocarregados, eliminando, assim, erros na atribuição de fórmulas moleculares para íons com cargas múltiplas.

Embora, a ESI seja a técnica de amplo uso para a caracterização das HS, a mesma tem algumas limitações, como: formação de íons de cargas múltiplas, agregados, adutos de sódio, é até uma possível supressão de algumas classes de compostos ou formação de fragmentos (Kujawinski, 2002). No caso específico da análise de HS, autores reportaram inconsistências entre a massa molecular média das HS quando medido por infusão direta no espectrômetro de massas (ESI-MS) e aquela obtida após um prévio particionamento da amostra em uma coluna analítica de exclusão por tamanho (HPSEC on-line ESI-MS). Essas inconsistências não

dependem das condições instrumentais, mas foram atribuídas a uma distribuição diferenciada relativa dos compostos hidrofóbicos e hidrofílicos em cada uma das frações separadas na coluna cromatográfica. Esta distribuição pode influenciar a capacidade de ionização na fonte de ESI. De fato, essa observação é uma limitação inerente da técnica de ESI, uma vez que compostos hidrofóbicos concentrados na superfície da gotícula podem ser preferencialmente ionizados, assim como, podem inibir completamente a ionização de moléculas mais hidrofílicas no interior da gotícula (Piccolo et al., 2010).

Sendo assim, nas análises usando a fonte de ESI como técnica de ionização alguns autores recomendam um fracionamento prévio da complexa mistura heterogênea do material húmico, o que pode ser conseguido por meio de métodos de separação como a HPSEC (Persson et al., 2000; Piccolo e Spiteller, 2003). No entanto, para realizar o fracionamento por exclusão molecular é necessário usar eluentes com elevada força iônica o que prejudica a eficiência de ionização para as análises por MS.

#### **I.4.1.8. Analisadores de massas usados para a caracterização das substâncias húmicas**

O espectro de massas de amostras de SOM e, especialmente de HA, é complexo por apresentar um grande número de sinais. Para que os resultados possam ser úteis é importante que o espectrômetro de massas tenha alta resolução.

O analisador de massas do tipo quadrupolo é o mais amplamente empregado, principalmente devido ao seu menor custo em relação a outros analisadores e por sua simplicidade de operação. Este analisador apresenta características de resolução de massa unitária e, portanto, mede a massa nominal ou massa inteira. Por exemplo, o íon de  $m/z$  249 com resolução unitária pode ser proveniente de compostos de fórmula molecular  $C_{19}H_7N$ ,  $C_{20}H_9$  ou  $C_{13}H_{19}N_3O_2$ . Apesar da baixa resolução dos espectrômetros de massas com analisador quadrupolar, a técnica é ainda útil para avaliar a massa molecular média das HS. Estudos reportados na literatura apontam valores de massa molecular média para os HA entre 600-1500 Da, os quais são de uma a três ordens de magnitude menores do que os que são comumente determinados por técnicas analíticas, como: osmometria, crioscopia, viscosidade, espalhamento de luz ou espalhamento de raios-X. Os resultados das análises por ESI-MS fornecem uma comprovação de que



a distribuição do tamanho molecular dos HA é limitada dentro de um intervalo relativamente estreito, sendo menores e menos polidispersos do que se tinha postulado inicialmente (Piccolo e Spiteller, 2003; Reemtsma e These, 2003).

A espectrometria de massas sequencial (MS/MS) é uma ferramenta analítica que pode fornecer informações sobre estruturas químicas e essa técnica foi empregada para propor estruturas presentes nas HS. Leenherr *et al.*, (2001) caracterizaram estruturalmente o padrão de FA (*Suwannee River, SRFA do IHSS*). Os autores propõem que a estrutura de um dos compostos provenientes do padrão de SRFA (*Suwannee River Fulvic Acid*) tem uma correlação estrutural com anidridos cíclicos derivados de poli-ácidos carboxílicos. Os autores também expõem uma limitação da técnica, que está relacionada com a clivagem de ligações lábeis de ésteres durante a análise, o que pode resultar numa redução relativa da massa molecular média estimada para os HA.

Existem outros analisadores de massas com maior poder de resolução do que o quadrupolo, como os analisadores de tempo de voo (ToF, *Time-of-Flight*), *Orbitrap* e o de ressonância ciclotrônica de íons (ICR, *Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*).

A espectrometria de massas de ultra-alta resolução de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) tem sido aplicada na caracterização da composição molecular de misturas complexas, tais como as HS (Kujawinski *et al.*, 2002; Stenson *et al.*, 2002). Esta é atualmente considerada a única técnica capaz de fornecer informação molecular detalhada já que pode resolver milhares de fórmulas moleculares individuais as quais são tipicamente encontradas em qualquer amostra de HA.

O ICR se destaca pela alta resolução que atinge com a qual é possível discriminar dezenas de compostos com a mesma massa nominal e medir a massa com alta exatidão com até quatro casas decimais. O nível de exatidão da medida de massa experimental em comparação com a massa teórica de um composto é determinado pelo erro em ppm. A resolução de massa em um analisador de ICR aumentam proporcionalmente com a diminuição da  $m/z$  do composto analisado. Em geral, o ICR permite medir a razão de  $m/z$  com erro menor de que 1 ou 2 ppm para compostos com até  $m/z$  1000 (Ohno *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos publicados na literatura tiveram como objetivo a caracterização de HS de diferentes origens e de alguns padrões do IHSS. Nestes

trabalhos foi possível verificar que as técnicas de MALDI-ToF/MS, LDI-ToF, ESI-ToF e FT-ICR MS fornecem informação complementares. Muitos autores apontam que, independentemente dos processos de humificação e da origem, as estruturas químicas das HS são similares. Entretanto, no trabalho de Peña-Mendez e colaboradores (2005), que empregaram ferramentas quimiométricas na análise dos dados obtidos por LDI-TOF de HA de solos coletados na Antártica, na República Checa, no México e Brasil foi sugerido que existem diferenças moleculares distinguíveis dos HA oriundos de diferentes regiões.

O uso da espectrometria de massas na caracterização de SOM de solos brasileiros ainda é muito incipiente. A maioria dos trabalhos realizados no país tem sido restrita à caracterização de solos por técnicas espectroscópicas convencionais. Na literatura foram encontradas apenas duas publicações que incluem a análise de amostras de solos brasileiros, oriundos da região de Cananeia e São Paulo, por espectrometria de massas de alta resolução para a caracterização molecular de HA e FA extraídos destes solos. No entanto, estes estudos experimentais foram conduzidos na Espanha (Baigorri et al., 2008; Pena-Mendez et al., 2005).

Uma vez que a FT-ICR MS é a técnica mais adequada para a caracterização das HS, essa será apresentada com mais detalhe a seguir.

#### **I.4.2. Espectrometria de massas de ultra-alta resolução de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS)**

O analisador de massas por ressonância ciclônica de íons (ICR) é utilizado para a determinação da razão massa/carga ( $m/z$ ), baseado na frequência ciclônica que os íons adquirem na presença de um campo magnético uniforme.

Na cela de ICR os íons são inicialmente excitados com um pulso de radio frequência (RF) aplicado em duas placas de excitação. Cada íon adquire uma frequência de oscilação (frequência ciclônica) que é inversamente proporcional a razão  $m/z$  na presença de um campo magnético (B) uniforme. Após a excitação, a corrente induzida gerada pelo movimento dos íons gera um sinal que é medido com duas placas de detecção (Heeren et al., 2004).

### **I.4.2.1. Parâmetros experimentais do ESI FT ICR para a caracterização das substâncias húmicas**

#### **I.4.2.1.1. Composição do Spray do ESI**

Os solventes usados no ESI podem influenciar fortemente a distribuição de massa molecular nas análises dos FA e HA. Diversos autores avaliaram a influência dos solventes na caracterização das HS, levando em consideração que o ESI é particularmente sensível ao teor de água e a presença de sais não voláteis. Esse é um ponto crítico, uma vez que as amostras de SOM muitas vezes têm altas concentrações de sais provenientes da natureza da amostra ou dos solventes empregados para a extração, lembrando que os HA são extraídos dos solos com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Kujawinski, 2002).

O solvente mais recomendado para a solubilização dos HA é uma mistura de água:metanol 70:30 v/v. Uma variação na composição relativa da composição do *spray* é capaz de ocasionar mudanças na distribuição de íons no espectro de massas. Foi verificado que uma proporção maior de água leva a uma diminuição na intensidade dos íons de massa molecular maiores (Brown e Rice, 2000; Kujawinski, 2002).

Em relação à concentração de sais no *spray* do ESI, pesquisas sugerem que medições sob condições de força iônica elevada resultam em uma corrente instável. Presença de sais de sódio nas amostras leva à formação de adutos de sódio e íons de cargas múltiplas que são mais dificilmente fragmentados. Esses problemas podem ser evitados adicionando hidróxido de amônia em vez de hidróxido de sódio às mostras (Brown e Rice, 2000).

Alguns autores sugerem realizar uma lavagem da amostra dos HA extraídos com uma mistura clorofórmio: metanol a fim de realizar a remoção de lipídeos ou percolar a amostra dissolvida em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por uma coluna de resina de troca catiônica para protonar os grupos funcionais ácidos. No caso do uso de trocadores catiônicos é importante lavar extensivamente a resina anterior ao uso para evitar a introdução de contaminantes (Ikeya et al., 2015).

#### **I.4.2.1.2. Potencial de ionização do ESI**

A caracterização das HS é conseguida mediante a aquisição dos espectros de massa por aplicação de potencial na fonte de ionização no modo positivo e/ou negativo.

Em geral os espectros das HS adquiridos no modo positivo são muito mais simples (menor número de sinais) do que os adquiridos no modo negativo. Isso é resultado dos locais limitados de carga positiva nas moléculas das HS (provavelmente grupos aminos). No entanto, a grande abundância de grupos funcionais facilmente ionizadas no modo negativo presentes nas HS, tais como grupos fenólicos e grupos carboxílicos, leva a espectros significativamente mais complexos quando o modo negativo na fonte ESI é empregado.

O potencial do ESI usado para ionizar os compostos presentes na mistura de HS pode alterar o perfil dos espectros de massa. Em diversos trabalhos reportados, foi encontrado que os espectros de massas das HS apresentam perfil bimodal o qual permite reconhecer a distribuição relativa, tanto de massas baixas quanto altas ao longo do intervalo de massa. Enquanto a aplicação de uma voltagem no cone de -20 ou -60 V favorece a ionização das moléculas de baixa massa molecular, voltagens na ordem de -40 V favorece a ionização de frações húmicas de massa molecular maiores que 400 Da (Piccolo et al., 2010; These e Reemtsma, 2003). Portanto, os espectros obtidos nestes dois potenciais fornecem informações complementares.

#### **I.4.2.1.3. Compilação das informações dos espectros de massa de substâncias húmicas adquiridos no FT -ICR MS**

Os espectros de massas de alta resolução das HS apresentam várias centenas de íons o que significa que a classificação e a atribuição manual das fórmulas moleculares são tarefas praticamente inviáveis (Kujawinski e Behn, 2006). Atualmente, os esforços têm sido direcionados para desenvolver ferramentas computacionais que permitam uma atribuição automática de fórmulas moleculares. Cabe destacar que ferramentas ou programas computacionais ainda não estão disponíveis comercialmente (Herzprung et al., 2014; Kujawinski e Behn, 2006).

Os parâmetros que precisam ser levados em consideração para atribuir as fórmulas moleculares as amostras de SOM, seja de forma manual ou automática, são:

#### **a) Recalibração interna**

Depois da aquisição dos dados, a exatidão de massa pode ser melhorada pela recalibração interna *offline* do espectro de massas, a qual consiste em uma correção matemática das razões de  $m/z$  a partir da seleção de íons com fórmula molecular verificada e da comparação da  $m/z$  experimental e a  $m/z$  teórica. As diferenças entre as  $m/z$  teóricas e  $m/z$  experimentais são usadas para calcular o erro sistemático em função da  $m/z$  e esta correção de  $m/z$  é, finalmente, aplicada a todos os íons do espectro de massas.

Outra ferramenta de cálculo para recalibração foi publicada por Savory et al. (2011). Os autores sugerem o uso de uma classe de compostos definida, que é selecionada no espectro, e empregada como padrão de calibração interna. Para a análise dos espectros de massas de HA, é usada a classe de compostos denominada como O10 (fórmulas moleculares com 10 oxigênios na estrutura) com intensidade relativa maior do que 10% para a recalibração (Savory et al., 2011).

#### **b) Seleção do limiar sinal/ruído nos espectros de massas dos HA**

A atribuição de fórmula molecular para os sinais de baixa intensidade (próximo ao ruído) nos espectros de massa de alta resolução não é confiável e, portanto, não é de interesse analítico. Para definir a intensidade mínima necessária para considerar os íons como sinal e não como ruído pode ser empregado o método de “n-sigma”, que se baseia no cálculo do desvio da linha base do ruído (Zhurov et al., 2014). Este método considera que o ruído do espectro de massas tem um comportamento gaussiano com centro no zero de intensidade. Com isso, um histograma do ruído em função da intensidade pode ser construído a partir dos sinais de menor intensidade a cada  $n$  sinais do espectro. Com essa população de sinais é calculado o desvio padrão da linha base do ruído e o limiar de intensidade é calculado multiplicando esse valor por uma constante  $N$ . Teoricamente, para  $N=3$ , o limiar obtido permite eliminar 99.7% do ruído ( $3\sigma$ ) presente no espectro.

#### **c) Atribuição das fórmulas moleculares**

Uma vez definido um valor máximo de erro de  $m/z$  e um limite sinal/ruído, o procedimento para atribuir as fórmulas moleculares aos íons detectados consiste em determinar a combinação de átomos que corresponde ao menor erro de massa,

isso dentro de limites previamente estabelecidos de números máximo e mínimo de cada tipo de átomo permitido. Na maioria de estudos de caracterização de SOM pela técnica de FT-ICR MS, a atribuição das fórmulas moleculares é realizada considerando combinações de átomos de C (2-50), H (5-100), O (0-30), N (0-2), S (0-2) e, em alguns estudos o P(0-1) também é considerado. Outros elementos como Na ou Cl podem ser importantes, dependendo do tipo de ionização utilizado (Koch et al., 2007; Ohno e Ohno, 2013).

Ainda com a elevada exatidão de  $m/z$  do FT-ICR MS ( $<1$  ppm), várias fórmulas moleculares podem ser atribuídas para um único íon. No entanto, cabe mencionar que o aumento da massa molecular de um composto, aumenta também o número de possíveis atribuições de fórmulas moleculares (Koch et al., 2007).

A título de exemplo, para as fórmulas moleculares  $C_{39}H_{25}O_2N_2$  ( $m/z$  553,19215) e  $C_{26}H_{33}O_{13}$  ( $m/z$  553,19266), o espectrômetro de massas teria que fornecer dados de  $m/z$  experimental com erro inferior a 0,46 ppm para que fosse possível identificar corretamente esses dois compostos. Geralmente o erro de  $m/z$  do instrumento é de até 1 ppm e, portanto, não podem ser descartadas as possíveis atribuições com erro menor que esse valor, a menos que outros critérios sejam levados em consideração. Vários autores sugerem que na atribuição de fórmulas moleculares, onde duas ou mais composições moleculares são viáveis, é preciso dar preferência para as fórmulas com baixas contagens de átomos de N e S (Herzprung et al., 2014). As limitações na atribuição de fórmulas moleculares podem ser contornadas seguindo algumas estratégias, bastante trabalhosas quando executadas manualmente, mas simples de aplicar com auxílio de softwares.

#### **a) Validação da fórmula molecular pela abundância relativa de isótopos.**

A presença, ausência e a intensidade relativa de um sinal proveniente de um isótopo estável pode ser usado para validar uma fórmula molecular. Para tanto, pode ser empregado qualquer isótopo que tenha uma abundância relativa suficiente para ser detectado. Por exemplo, a abundância natural relativa do isótopo de  $^{13}C$  é de 1,07% em relação ao  $^{12}C$ . Um composto orgânico contendo 30 átomos de carbono deve gerar no espectro um sinal em  $+ 1,0034 m/z$  ( $^{13}C_1 \ ^{12}C_{29}$ ) com uma intensidade de 32%. No caso anteriormente mencionado, a fórmula molecular do sinal detectado em  $m/z$  553.192 pode ser verificada pelo padrão isotópico, de forma tal que, se o sinal do isótopo com um  $^{13}C$  apresenta uma abundância relativa

próxima a 28% significa que a molécula deve ter 26 carbonos ( $28\% / 1,07\%$ ) e, portanto, pode ser descartada a fórmula  $C_{39}H_{25}O_2N_2$  ( $m/z$  553,19215) e atribuída à fórmula  $C_{26}H_{33}O_{13}$  ( $m/z$  553,19266). Nos espectros de SOM as abundâncias dos isotopólogos são influenciadas principalmente pelo  $^{13}C$ ,  $^{34}S$  e  $^{37}Cl$ , quando presentes, os quais ocorrem com abundâncias naturais de 1,1; 4,2 e 24%, respectivamente.

#### **b) Verificação da presença de séries homólogas**

Para avaliar a presença de séries homólogas é verificado nos espectros a presença de sequências de sinais com espaçamentos regulares de massa. As séries homólogas são baseadas em adições de grupos funcionais entre as fórmulas moleculares, sendo que estes espaçamentos regulares podem ser atribuídos a mudanças moleculares específicas formando “famílias de moléculas” com estruturas químicas semelhantes (Herzprung et al., 2014; Koch et al., 2007; Kujawinski e Behn, 2006). Vários tipos de séries de íons foram detectados na maioria dos espectros da SOM, por exemplo, series isobáricas de íons polioxigenados (CHO), tais como  $C_{22}H_{23}O_{11}^-$  ( $m/z$  463,12458),  $C_{23}H_{27}O_{10}^-$  ( $m/z$  463,16097),  $C_{24}H_{31}O_9^-$  ( $m/z$  463,19736),  $C_{25}H_{35}O_8^-$  ( $m/z$  463,23374) e  $C_{26}H_{39}O_7^-$  ( $m/z$  463,27013). Estes íons apresentam valores de  $m/z$  com diferenças de 0,0364 Da e, portanto, esses íons pertencem a séries com repetidas diferenças de um carbono mais quatro hidrogênios e perda de um átomo de oxigênio,  $(CH_4) 16,0313 - (O) 15,9949 = 0,0364$  Da.

#### **I.4.2.1.4. Apresentação de resultados dos espectros de massas das HA**

Após o cálculo das fórmulas moleculares se faz necessário tratar a enorme quantidade de dados obtidos de forma eficiente. Até a presente data, os pesquisadores têm usado diversas estratégias de tratamento de dados de espectros de massas de alta resolução, tais como a análise das séries homólogas de Kendrick (Wu et al., 2004), diagramas de van Krevelen (Abdulla et al., 2013; Kim et al., 2003) e gráficos de DBE vs C (Hockaday et al., 2006).

#### **a) Gráfico de classes de compostos**

A maioria das fórmulas moleculares a serem atribuídas nos espectros de massas da HS apresentam no máximo dois tipos de heteroátomos, um deles oxigênio e o outro podendo ser enxofre, nitrogênio ou cloro. Como isso, estas

fórmulas moleculares podem ser agrupadas em “famílias de compostos” que contêm os mesmos tipos e quantidades de heteroátomos. Como exemplo, todas as fórmulas moleculares, compostas por qualquer quantidade de carbonos e hidrogênios mais dois átomos de oxigênio, podem ser agrupadas e classificadas como classe O<sub>2</sub>, e as fórmulas moleculares com qualquer número de C e H, além de um átomo de N e um O, são classificadas como classe NO. De forma similar, podem ser denominados outros tipos de compostos, como: CHON, CHOS e CHOCI. Assim, podem ser construídos gráficos de barras de intensidade total de classes de compostos e gráficos de barras de número de compostos de cada classe. Esta representação gráfica facilita a interpretação e agrupamento do enorme número de dados gerados nos espectros de massas de SOM.

#### **b) Diagramas de van Krevelen**

Uma importante ferramenta que é amplamente empregada para observar variações composicionais de dados obtidos por FT-ICR MS é o diagrama de van Krevelen, no qual as fórmulas moleculares individuais são plotadas em função das razões molares H/C e O/C. Assim, cada ponto no diagrama representa uma fórmula molecular com uma razão específica de H/C e O/C. As fórmulas moleculares plotadas no diagrama podem ser classificadas em seis regiões distintas: lipídeos (H/C= 1,5–2,0, O/C= 0–0,3), proteínas e outros compostos alifáticos (H/C= 1,5–2,2, O/C = 0,1–0,67), ligninas (H/C= 0,7–1,5, O/C = 0,1–0,67), aromáticos condensados (H/C= 0,2–0,7, O/C = 0–0,67), carboidratos (H/C= 1,5–2,4, O/C = 0,67–1,2), e hidrocarbonetos insaturados (H/C= 0,7–1,5, O/C = 0–0,1)(Kim et al., 2003).

A partir de pesquisas realizadas com HA de amostras provenientes do IHSS e amostras coletadas em diferentes ambientes, foi estabelecido um consenso referente às características estruturais dos HA. Foi concluído que em geral os HA, independentemente do ecossistema, da região, o clima e a classe textural de solo em que foram extraídos, apresentam predominância de três componentes moleculares: moléculas com fórmulas moleculares semelhantes às das ligninas ( $0.2 \leq O/C \leq 0.6$ ,  $0.6 \leq H/C \leq 1.2$ ), as quais são tidas como substrato principal para reações subsequentes do processo de humificação, moléculas alifáticas contendo carboxilas ( $0.85 \leq H/C \leq 2$ ,  $O/C \leq 0.4$ ) e moléculas aromáticas condensadas as quais apresentam semelhança com o *Black carbon* (Chen et al., 2014; DiDonato et al., 2016; Ikeya et al., 2015; Kramer et al., 2004) Apesar da FT-ICR MS não ser uma técnica quantitativa, a partir dos diagramas de van Krevelen é possível avaliar a



abundância relativa de compostos em cada classe química presente nas amostras (Kim et al., 2003; Wu et al., 2004).

### **c) Gráfico de séries homólogas: gráfico de Kendrick**

Os espectros de matéria orgânica natural, entre eles os HA, exibem sequências de sinais com espaçamentos regulares de massa, sendo que essas famílias de moléculas são frequentemente denominadas como séries homólogas. As séries homólogas são compostos cujas fórmulas moleculares diferem apenas por adições sucessivas de grupos de átomos, por exemplo sequências de  $\text{CH}_2$  (diferenças de 14,01565 Da). Cabe ressaltar que estes espaçamentos regulares ocorrem independentemente das configurações do instrumento. A verificação destas séries homólogas também é útil na hora de atribuir a fórmula molecular de compostos que aparecem com baixa intensidade e que muitas vezes não podem ser verificadas pelo padrão isotópico.

De forma similar, outros compostos podem ser agrupados e classificados em séries homólogas. Diferenças sucessivas de  $\Delta m/z$  de 0,0364 unidades e intensidades formando um padrão com formato gaussiano é indicativo de que esses compostos pertencem a uma serie homóloga com ganhos repetidos de um carbono mais quatro hidrogênios e perda de um oxigênio ( $(\text{CH}_4) 16,0313 - (\text{O})15,9949 = m/z 0,0364$ ), sendo que esta diferença de massa poderia surgir a partir de espécies que diferem somente na presença de substituintes acetato e aldeído. As séries de 2,0156 Da (adição de  $\text{H}_2$ ) muito provavelmente são devido aos íons húmicos que diferem uns dos outros em grau de saturação, uma vez que cada dupla ligação (ou anel) requer a perda de dois átomos de hidrogênio. Nos espectros de SOM também podem ser encontrados outros tipos de séries homólogas referentes a diferenças  $m/z$  42,0106 Da ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ , grupos acetila), 44,0262 Da ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ , grupos hidroxietil ou etóxido), 58,0055 Da ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ , grupos carboximetil ou acetato) e de 44,0095 da correspondente a grupos carboxilas (Stenson et al., 2002).

Essas séries homólogas podem ser visualizadas por meio da análise do defeito de massa de Kendrick. Isso é possível já que todos os compostos que pertencem a uma mesma série homóloga de  $\text{CH}_2$ , por exemplo, apresentam valores idênticos de defeitos de massas de Kendrick (KMD) e são compostos com a mesma constituição de heteroátomos e mesmo número de anéis e ligações duplas, diferindo somente no número de grupos  $\text{CH}_2$ .

O KMD pode ser calculado a partir da diferença da massa de Kendrick nominal e a massa exata de Kendrick (Equação 1). A massa exata de Kendrick é calculada pela Equação 2 e a massa nominal de Kendrick é o valor inteiro de massa exata de Kendrick arredondado para cima (Hughey et al., 2001).

$$\mathbf{KDM} = \text{Massa de Kendrick nominal}_{(F.Molecular)} - \text{Massa exata de Kendrick} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\mathbf{Massa\ exata\ de\ Kendrick\ CH2} = \text{Massa\ exata}_{(F.\ molecular)} \frac{14,00000}{14,01565} \quad (\text{Eq. 2})$$

Os gráficos de KDM vs massa de Kendrick nominal permitem a identificação de "outliers". Uma vez que uma série de compostos relacionados entre si (uma serie homóloga) tem sido identificada, então é possível realizar uma extensão deste padrão a valores de massa moleculares mais elevados, permitindo uma correta atribuição da composição elementar de íons cujo valor de massa é muito alto para permitir a atribuição única com base apenas na massa medida do pico no espectro. (Hughey et al., 2001).

A abordagem de análise de dados mediante o defeito de massa de Kendrick permitiu, além da validação de atribuição de fórmulas moleculares, o estabelecimento de estruturas moleculares específicas. Kramer e colaboradores (Kramer et al., 2004) assinam estruturas moleculares aos compostos reconhecidos como aromáticos condensados (segundo o diagrama de van Krevelen), encontrando que são um conjunto de moléculas contendo de quatro (tetraceno) até sete (heptaceno) anéis com número de grupos carboxila em cada estrutura variando de três a oito. Assim, atribuíram a estas moléculas valores médios de átomos de oxigênio entre 7 e 12. Já foi relado na literatura que estes compostos podem atuar como sítios de sorção com características hidrofóbicas com características hidrofóbicas e iônicas (Hockaday et al., 2006).

#### **d) Gráfico de DBE e índice de aromaticidade**

O DBE (do inglês, *Double Bond Equivalent*) indica o número total de ligações  $\pi$  mais o número de anéis em uma molécula. Este parâmetro pode ser calculado a partir da fórmula molecular por meio da Equação 3, onde  $N_i$  é o número de átomos e  $V_i$  é a valência dos  $i$  elementos que compõem a fórmula molecular.

$$DBE = 1 + \frac{\sum_i^{i\max} N_i (V_i - 2)}{2} \quad (\text{Eq. 3})$$

Considerando a presença de elementos comuns nos HA (C, H, O, N, S) e suas valências prevalentes, a DBE de fórmulas moleculares destes pode ser expressa pela Equação 4.

$$DBE = 1 + \frac{2C - H + N + P}{2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Moléculas saturadas têm DBE igual à zero. A diminuição do número de átomos de hidrogênio em uma estrutura orgânica conduz a um aumento no valor de DBE (o DBE aumenta em uma unidade por cada dois átomos de hidrogênio a menos). O DBE é independente do número de átomos de oxigênio e enxofre.

A razão DBE/C (onde C é o número de carbonos) de uma molécula é um parâmetro comumente empregado como indicador da densidade de insaturação de hidrocarbonetos. Qualquer hidrocarboneto com DBE/C acima de 0,67 corresponde a um composto aromático condensado e, de forma similar, todo hidrocarboneto com DBE/C acima de 0,50 corresponde inequivocamente a um composto aromático. Para o caso da SOM, a presença de heteroátomos pode influenciar o DBE pela possível existência de ligações duplas C-heteroátomo e pode gerar valores maiores de DBE em contraste com o número de ligações duplas C-C mais anéis. Isso faz com que o limiar de DBE/C > 0.67 não seja apropriado para prever estruturas aromáticas condensadas para compostos que contem heteroátomos.

Recentemente, foi proposto o índice de aromaticidade (AI) (Equação 5) com o intuito de obter um parâmetro aplicável às fórmulas moleculares que contem heteroátomos e que permita determinar se uma fórmula molecular corresponde inequivocamente a um composto aromático ou aromático condensado (Koch e Dittmar, 2006; Melendez-Perez et al., 2016)

$$AI = \frac{1+0,5((2 \times C)-H-(2 \times O)-(2 \times S)-N-P)}{C} \quad (\text{Eq. 5})$$

A partir do cálculo do valor de AI é possível prever que qualquer fórmula molecular assinada numa amostra de SOM com AI > 0,67 é inequivocamente um composto aromático condensado. Do mesmo modo, qualquer fórmula molecular com

$AI > 0,5$  também é inequivocamente atribuída a um composto aromático. Portanto, esta previsão é mais conservadora do que aquela levando em consideração a DBE obtida pela equação 4.

Entretanto, com a elevada densidade de dados fornecida pelas técnicas de espectrometria de massas a síntese da informação e a interpretação são ainda um grande desafio. As abordagens tradicionais não são suficientes para aproveitar todas as informações estruturais significativas dos espectros e a aplicação de métodos multivariados quimiométricos se faz fundamental.

---

---

## **II. OBJETIVOS**

---

---

O objetivo principal desta tese foi estudar os mecanismos de interações que podem ocorrer no processo de sorção de antimicrobianos de uso veterinário na matéria orgânica de solos característicos do Brasil, assim como, avaliar a contribuição das substâncias húmicas para sorção e dessorção destes compostos.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Coletar e caracterizar diversos tipos de solos que sejam representativos do estado de São Paulo;
- Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de fármacos de uso veterinário da classe das fluoroquinolonas e sulfonamidas em extratos de ácidos húmicos;
- Avaliar os procedimentos para extração e purificação da matéria orgânica (matéria orgânica solúvel em água e ácidos húmicos) nos diferentes solos;
- Realizar estudos de sorção e dessorção dos fármacos com os ácidos húmicos extraídos dos solos, conforme o guia da OECD 106;
- Caracterizar os ácidos húmicos extraídos dos solos por análise elementar, ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido e infravermelho;
- Avaliar a composição molecular da matéria orgânica extraída dos solos por espectrometria de massas de ultra-alta resolução (espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier);
- Estudar possíveis interações, em nível molecular, envolvidas entre os ácidos húmicos extraídos dos solos com diferentes quantidades de matéria orgânica e os antimicrobianos, por infravermelho e espectroscopia de massas de ultra-alta resolução.

---

### **III. EXPERIMENTAL**

---

### **III.1. Equipamentos, reagentes e amostras**

#### **III.1.1. Equipamentos**

Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência Waters (EUA) composto de uma bomba binária Waters (modelo 1525), um detector de arranjo de fotodiodos Waters (modelo 2996) e um detector de fluorescência Waters (modelo 2475), um forno de coluna e um sistema de injeção automática Waters (modelo 2707). Sistema de aquisição de dados: software Empower®3.

Analizador elementar CNHS Perkin Elmer 2400.

Espectrômetro Bruker Avance III operando a uma ressonância  $^{13}\text{C}$  de frequência de 300 MHz, equipado com rotor de zircônia cilíndrico (diâmetro 4 mm).

Espectrômetro de infravermelho FT-IR Cary 630-FTIR da Agilent, com acessório de refletância total atenuada (ATR) horizontal empregando um cristal de diamante.

Espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) da Thermo Scientific (Alemanha).

Câmara incubadora refrigerada com agitação orbital modelo MA 832 Marconi, (Brasil).

Liofilizador Virtis Benchtop “k”, SP Industries, Gardiner (EUA)

Balança analítica modelo XT220A, Precisa (Brasil) e balança analítica modelo CPA 225D Sartorius (Brasil).

Centrífuga modelo Rotofix 32A (Hettich, Alemanha).

Agitador de tubos tipo vortex modelo Genius 3, IKA (EUA).

#### **III.1.2. Padrões, solventes e reagentes e soluções**

Foram usados padrões analíticos de ciprofloxacina (98%), enrofloxacin (98%) e sulfaquinoxalina (95%) todos obtidos junto a Fluka (EUA).

Para as análises cromatográficas foi utilizado metanol grau HPLC da Tedia, (EUA).

A solução estoque de ENR e CIP em  $\text{CaCl}_2$  foi preparada dissolvendo 100 mg de analito em 0,5 mL de ácido acético e o volume foi completado a 100 mL com solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Foi preparada uma solução de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SQX usando como solvente solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ .



Os reagentes, grau PA, foram: ácido acético, ácido fórmico, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de sódio e cloreto de magnésio da Nuclear (Brasil). O sal dissódico do ácido etilenodiamino tetra-acético, ácido fluorídrico foram obtidos junto a J.T. Baker (EUA).

### **III.1.3. Amostras: solos e ácidos húmicos**

Estudos iniciais foram realizados com sete tipos de solos característicos do Estado de São Paulo. Todos os solos foram coletados na profundidade de 0-20 cm, secas ao ar, peneiradas ( $\leq 2$  mm) e estocadas em temperatura ambiente no laboratório.

Os solos foram denominados conforme as suas classificações e simbologias do Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – SiBCS. As abreviações usadas em laboratório (N1, N2, S1 e S2) em outros trabalhos desenvolvidos no grupo foram mantidas neste trabalho para fins de rastreabilidade.

**RQ:** Neossolo Quartzarênico: Solo denominado de N1, coletado na área de pastagem da Escola Técnica de Santa Rita de Passa Quatro, SP, (latitude 21°42'18,12"S, longitude 47°28'04,82"O);

**LV:** Latossolo Vermelho: Solo denominado N2, coletado na área de plantio de cana de açúcar de Sertãozinho, SP, Brasil (latitude 21°05'20,44"S, longitude 47°48'10,73"O);

**LVA:** Latossolo Vermelho Amarelo: Solo denominado S1, coletado na área de antiga plantação de citrus, atualmente coberta com brachiaria do campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP (latitude 22°43'14,92"S, longitude 47°01'14,20"O);

**PVA:** Argissolo Vermelho Amarelo: Solo denominado S2, área coberta com brachiaria do campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP (latitude 21°42'59,50"S, longitude 47°01'00,05"O);

**LVAd:** Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico: Coletado na Fazenda Santa Elisa, IAC, Campinas, SP (latitude 22° 51' 28" S e longitude 47° 05' 56" O);

**RQo:** Neossolo Quartzarênico Órtico: Coletado em Piracicaba, SP (latitude 22° 33' 53" S e longitude 47° 52' 06" W);

**LVe:** Latossolo Vermelho eutrófico: Coletado na Fazenda Santa Elisa, IAC, Campinas, SP (latitude 22° 51' 37.55" S e longitude 47° 04' 34.30" O).

Entretanto, buscando uma melhor compreensão do mecanismo de sorção dos antimicrobianos foram incluídas amostras de nove HA extraídos de outros tipos de solos e diferentes do que os listados anteriormente. Estas amostras de HA foram cedidas pelo Dr. Ademir Fontana, pesquisador da EMBRAPA do Rio de Janeiro. Este conjunto de amostras incluiu HA extraídos de Organossolos, Cambissolos, Espodossolos e Gleissolos e uma amostra de HA extraído de sedimento marinho. Estes HA foram empregados em outros trabalhos já publicados (Fontana et al., 2008a; Fontana et al., 2008b; Santos et al., 2013).

**OX (MS2):** Organossolo háplico (H hístico), coletado em campo de várzea muito mal drenado, Porto Morumbi, MS;

**OX (SC1):** Organossolo háplico (H hístico), coletado em campo de gramínea muito mal drenado, Gravata, SC;

**OXs (SP1):** Organossolo haplico Sáprico, coletado em campo de várzea muito mal drenado, Taubaté, SP;

**O (RJ2):** Organossolos (O hístico), coletado na região de Itatiaia, RJ;

**CH (MB4):** Cambissolo A Húmico, coletado na região de Bocaina de Minas, MG;

**EK (RS1):** Espodossolo Humilúvico, coletado em campo de araucárias, Canela, RS;

**EK (RO):** Espodssolo Humilúvico, coletada em área coberta com brachiaria, floresta amazônica, Machadinho d´ Oeste, RO;

**SPB:** Amostra de sedimento marinho, coletada em Cananeia, SP;

**GM (PM):** Gleissolo Melânico, coletado em área de pastagem muito mal drenado, Rio de Ostras, RJ.

## **III.2. Procedimento Experimental**

### **III.2.1. Isolamento dos HA dos solos**

Os ensaios de extração e fracionamento de substâncias húmicas dos sete solos coletados foram realizados conforme método proposto pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014).

A uma quantidade de 250 g de amostra de solo, foram adicionados 50 mL de solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, com a finalidade de reduzir o pH do solo a aproximadamente 1. Em seguida, foram adicionados 450 mL de solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Após agitação horizontal por 1 h, o material foi centrifugado a 10.000 g (FCR média) por 15 min.

O precipitado foi separado e, imediatamente, o pH foi ajustado para 7, por adição de solução aquosa de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> e adicionados mais 500 mL de solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O extrato foi agitado horizontalmente por 4 h. Após este período de tempo, a suspensão foi deixada em repouso durante 12 horas.

O sobrenadante (fração de HA) foi separado e o pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup>. A suspensão foi deixada em repouso durante 18 horas para que houvesse decantação.

Após 18 h, o excesso de sobrenadante (fração contendo ácido fúlvicos) foi separado e descartado. O restante do material foi centrifugado a 5.000 g (FCR média), por 10 min, e o sobrenadante descartado.

O HA (precipitado) foi redissolvido em 20 mL de solução de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> seguido da adição de KCl sólido até uma concentração de 0,3 mol L<sup>-1</sup>; o processo foi repetido por mais duas vezes. Essa etapa no preparo permitiu a eliminação de coloides inorgânicos.

O HA foi re-precipitado por adição de 5 mL de solução HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> e depois de repouso por 16 horas, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado.

Em sequência, o HA precipitado foi resuspendido em solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl e 0,3 mol L<sup>-1</sup> de HF. A mistura foi deixada em agitação horizontal durante 16 horas para possibilitar a solubilização de silicatos. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado.

Finalmente o conteúdo de HA obtido foi dialisado em membranas de exclusão molar de massa de 1000 Daltons (Spectra/Por®1. CA. EUA) em água deionizada por três dias. A água de diálise foi trocada diariamente, e até que não fosse mais detectada a presença de cloreto (teste de precipitação com AgNO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>) na solução externa da membrana. Após o processo de diálise, os HA foram liofilizados.

Para a extração da amostra HA-PVA(S2) (Argissolo vermelho-amarelo) foi preciso mudar o procedimento de extração. Na etapa de solubilização dos HA, a

solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi substituída por solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Tatzber et al., 2007). Esta extração em meio neutro favoreceu a solubilização dos HA deste solo.

### **III.2.2. Caracterização molecular dos ácidos húmicos**

Após extração, purificação e liofilização dos HA provenientes dos sete solos coletados foi realizada a caracterização usando as técnicas de análise elementar e NMR.

#### **III.2.2.1. Análise elementar**

As medidas foram feitas, em duplicata, usando 2 mg de amostra de HA, no equipamento analisador elementar CNHS Perkin Elmer 2400. A porcentagem de oxigênio foi calculada baseada na diferença entre 100% e a porcentagem global de C, H e N.

#### **III.2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C no estado sólido**

Os espectros de NMR foram obtidos operando a uma ressonância <sup>13</sup>C de frequência de 300 MHz, utilizando a técnica de ângulo mágico e desacoplamento de alta potência de prótons. As amostras de HA dialisadas foram empacotadas em um rotor de zircônia cilíndrico (diâmetro 4 mm) o qual girou a uma frequência de 10 kHz. Um tempo de contato de 0,8 ms, e um pulso de atraso de 60 s foi empregado; nestas condições foi necessário acumular um total de 3862 espectros (36 horas por análise).

#### **III.2.3. Método para a determinação dos fármacos em extrato de ácidos húmicos por HPLC-DAD-FLD**

Os antimicrobianos ENR, CIP e SQX foram empregados como moléculas molde nestes estudos.

A separação da CIP e ENR foi realizada em uma coluna C18 Zorbax Eclipse Plus 4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Agilent), a 40 °C, usando como fase móvel metanol: ácido fórmico 0,1% (30:70 v/v). A eluição foi realizada em modo isocrático. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$  e a vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . A detecção foi realizada com um detector de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 470 nm, respectivamente.

A separação da SQX também foi realizada em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus 4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Agilent). A fase móvel foi metanol adicionado de ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico aquoso 0,1% (40:60 v/v) e a eluição foi realizada em modo isocrático a uma vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. O volume de injeção foi de 15  $\mu\text{L}$ . A quantificação foi realizada com detector de arranjo de fotodiodos no comprimento de onda de 255 nm.

As condições da separação cromatográfica foram otimizadas por meio da avaliação dos seguintes parâmetros de conformidade do sistema: número de pratos ( $N > 2000$ ), fator de retenção ( $k > 2$ ), fator de assimetria ( $0,9 < A_s < 1,2$ ) e resolução ( $R_s > 1,5$ ).

Para quantificação dos analitos foi utilizada uma curva analítica de trabalho no extrato de HA na faixa de 0,05 a 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **III.2.4. Avaliação do potencial de sorção dos fármacos nos ácidos húmicos**

Os estudos de sorção/dessorção foram realizados seguindo as diretrizes da EMA, conforme as recomendações do Guia 106 da OECD. Este Guia (OECD 106, 2000) orienta os estudos de sorção em solos e, portanto, a fim de aplicar o procedimento na avaliação do potencial de sorção nos HA, algumas adaptações foram necessárias.

O procedimento conforme preconizado no Guia é ilustrado na **Figura 5**. As etapas que envolvem o experimento são descritas a seguir:

**Etapas 1:** Em tubos de polipropileno tipo Falcon, com capacidade para 50 mL, foi pesada uma massa determinada de HA sólido e adicionado um volume determinado de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$  (solução eletrólito). A suspensão foi agitada horizontalmente em câmara incubadora refrigerada à 125 rpm e a 25 °C, ao

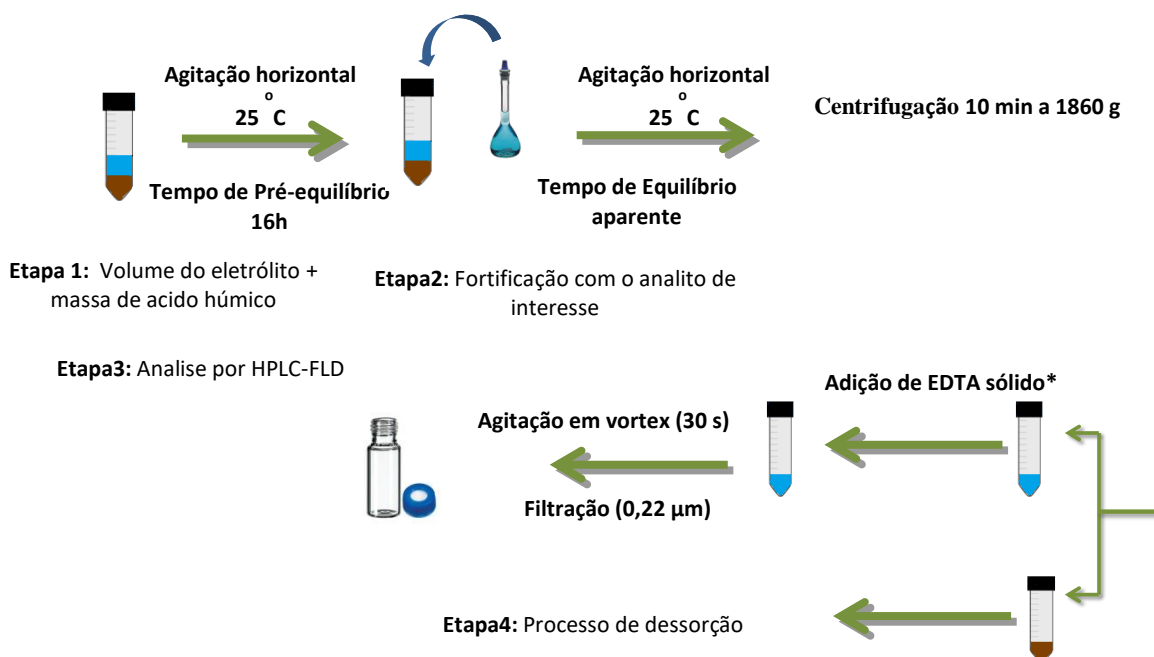
abrigo de luz por 12 h (denominado tempo de pré-equilíbrio). Para os estudos com SQX foram empregados frascos de vidro em vez de polipropileno, com capacidade para 15 mL.

**Etapas 2:** Após o tempo de pré-equilíbrio, foi adicionada uma alíquota da solução do fármaco em solução aquosa de maneira que a concentração inicial no extrato fosse pelo menos duas ordens de magnitude maior que o limite de detecção do método e que o volume adicionado fosse 10% do volume total de solução. As misturas foram então agitadas por um período de 48 h, denominado tempo de equilíbrio aparente e, em seguida, centrifugadas a 1860 g por 10 min. Após o tempo de equilíbrio aparente, o sobrenadante de cada frasco (denominado extrato) foi então removido.

**Etapas 3:** Uma alíquota de 5 mL do extrato foi retirada, filtrada com filtro de membrana de 0,22 µm e analisada pelos métodos desenvolvidos (**descrito no item III.2.3**). Para os estudos com os fármacos CIP e ENR, EDTA sólido para uma concentração final de 0,05 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado às soluções anteriormente às injeções no cromatógrafo.

**Etapas 4:** Para construção das isotermas de dessorção, a fase aquosa foi repostada à cada amostra de HA remanescente do estudo de sorção e as misturas permaneceram sob agitação por 56 h. Após este período, as misturas foram centrifugadas a 1860 g por 10 min e o sobrenadante (extrato) removido.

Uma alíquota de 5 mL do extrato foi retirada, filtrada com filtro de membrana de 0,22 µm e analisada pelos métodos desenvolvidos (**descrito no item III.2.3**). Para os estudos com os fármacos CIP e ENR, EDTA sólido para uma concentração final de 0,05 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado às soluções anteriormente às análises cromatográficas.



**Figura 5** – Esquema do procedimento adotado para a avaliação da sorção e desorção de ENR, CIP e SQX nos HA.

### III.2.5. Estudos preliminares

A extensão da sorção e desorção dos fármacos nos HA foi determinada por meio de medidas indiretas, nas quais a quantidade sorvida do fármaco foi calculada pela diferença entre a sua concentração inicial na solução e a sua concentração final na solução após o processo de sorção. O método indireto exige que estudos preliminares sejam realizados para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, incluindo a avaliação da estabilidade do fármaco em solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  durante o período de estudo, bem como a possibilidade de sorção do analito nos frascos empregados. Também é importante avaliar o efeito matriz do extrato na quantificação dos analitos.

Todos os estudos preliminares foram realizados usando HA extraídos de três solos: HA-LVAd, HA-LVe e HA-RQo.

### III.2.5.1. Avaliação do efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz do extrato de HA nas análises cromatográficas dos fármacos ENR e CIP, foram pesados 10 mg da amostra de HA extraído e adicionados 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>. Para a SQX foram adicionados apenas 2 mL. Após um tempo de pré-equilíbrio de 12 h, o sobrenadante foi coletado e fortificado por adição de uma alíquota do analito a ser estudado (ENR, CIP ou SQX) para uma concentração final no extrato de 0,5 µg mL<sup>-1</sup>. O extrato foi então filtrado com filtro de membrana de 0,22 µm e analisado por HPLC-DAD-FLD.

Para o estudo do efeito matriz foram realizados dois estudos:

- **Efeito do pH do extrato:** foram preparados extratos de HA como anteriormente descrito, no entanto, antes da análise cromatográfica o pH da solução de  $\text{CaCl}_2$  foi ajustado para valores entre pH 1 a 8.
- **Efeito do agente quelante:** extratos de HA foram preparados conforme descrito anteriormente, incluindo uma etapa de adição de EDTA sólido antes da análise cromatográfica. Foram avaliadas concentrações de EDTA na faixa de 0,01 a 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

O efeito matriz foi avaliado considerando nos cromatogramas, as áreas e a pureza dos picos cromatográficos.

### III.2.5.2. Estabilidade dos fármacos na solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L<sup>-1</sup>

A estabilidade dos fármacos em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup> foi avaliada na concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup> usando frascos de polipropileno tipo Falcon para CIP e ENR e tubos de vidro para SQX. As soluções foram deixadas em agitação durante 56 h. A quantificação dos fármacos foi realizada por meio de padronização externa, de acordo com o método cromatográfico descrito no **item III.2.3.**



### III.2.5.3. Determinação da razão ácido húmico/ solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L<sup>-1</sup>

Para estabelecer a razão de ácido húmico/solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup> mais apropriada a ser empregada nos estudos de sorção e dessorção, foram avaliadas as seguintes razões:

- Para ENR e CIP: 4 mg de HA para 10, 20, 30 e 50 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>.
- Para SQX: 4 mg de HA para 1, 2, 5, 10 e 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>.

Após um tempo de pré-equilíbrio de 12 h, as misturas (HA + solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>) foram fortificadas com cada fármaco individualmente (concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup> na mistura) e agitadas durante mais 48 h (tempo de equilíbrio aparente). Após este período, as misturas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram recolhidos e analisadas por HPLC-DAD-FLD, como anteriormente no **item III.2.3**.

Conforme recomendação do Guia 106 da OECD, a razão solo/solução apropriada para os estudos de sorção/dessorção deve satisfazer uma percentagem sorvida do analito superior a 20% e, preferencialmente, maior que 50%.

A percentagem de sorção de analito no HA foi calculada pela Equação 6, sendo a massa da substância teste calculada pela Equação 7 e a massa da substância teste no HA pela Equação 8

$$A_{ti} = \frac{m_s^{ads}(ti)100}{m_0} \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo,

$$m_0 = C_0 V_0 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$m_s^{ads}(ti) = m_0 - C_{aq}^{ads}(ti)V_0 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde,

$A_{ti}$  = percentagem de sorção no tempo  $t_i$

$m_s^{ads}$  = massa da substância teste no sorvente (HA) no tempo  $t_i$  (µg)

$m_0$  = massa da substância teste no frasco no início do experimento (µg)

$C_0$  = concentração inicial da solução em contato com o sorvente (µg mL<sup>-1</sup>)

$C_{aq}^{ads}(ti)$  = concentração da substância na fase aquosa no tempo  $t_i$  (µg mL<sup>-1</sup>)

$V_0$  = volume inicial de solução em contato com o sorvente (mL)

#### III.2.5.4. Determinação do tempo de equilíbrio aparente (cinética de sorção)

O volume selecionado de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme descrito no item anterior, foi agitado com 4 mg de HA extraídos dos solos LVAd, LVe e RQo por um tempo de pré-equilíbrio de 12 h. Após este período, foi adicionada uma alíquota da solução de fármaco a uma concentração inicial de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As misturas foram agitadas horizontalmente por um tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h (para cada um dos tempos foi realizada uma duplicata de análise).

Após o tempo de agitação, as suspensões foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi coletada e analisada pelos métodos desenvolvidos (item III.2.3).

Para avaliar o mecanismo cinético envolvido na sorção dos fármacos, bem como a capacidade de sorção do material húmico, os modelos matemáticos cinéticos de pseudo-primeira-ordem (PPO), pseudo-segunda-ordem (PSO) e Elovich foram aplicados, conforme descrito em estudos prévios (Peruchi et al., 2015).

O modelo de pseudo-primeira-ordem é descrito pela Equação 9:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde,  $q_e$  é a concentração máxima sorvida no equilíbrio e  $k_1$  é a constante para o modelo cinético de pseudo-primeira-ordem. O gráfico de  $\log(q_e - q_t)$  *versus*  $t$  é uma reta onde  $\log q_e$  e  $-k_1/2,303$  correspondem ao intercepto e a inclinação, respectivamente (Plazinski et al., 2009; Qiu et al., 2009).

O modelo de pseudo-segunda-ordem considera que a capacidade de sorção é proporcional ao número de sítios ativos ocupados e sua forma linear pode ser representada pela Equação 10.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde,  $q_e$  e a constante de segunda ordem ( $k_2$ ) são determinadas diretamente a partir da inclinação e intercepto da reta, obtida do gráfico de  $t/q_t$  *versus*  $t$ , respectivamente (Plazinski et al., 2009).

O modelo de Elovich considera que a cinética de sorção ocorre rapidamente na etapa inicial, associada ao movimento do composto com a maior parte acessível do sorvente, seguida de uma etapa lenta, devido à difusão da partícula para dentro e fora dos microporos do sorvente (Fernandez-Bayo et al., 2008; Plazinski et al., 2009). A Equação 11 apresenta a forma linearizada da equação de Elovich.

$$q_t = \frac{1}{Y} \ln(XY) + \frac{1}{Y} \ln t \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde, X e Y são constantes. O intercepto  $(1/Y)\ln(XY)$  corresponde à quantidade sorvida durante a etapa rápida ( $q_{\text{fast}}$ ), enquanto a inclinação  $(1/Y)$  representa a sorção lenta relacionada com a duração da segunda etapa (Fernandez-Bayo et al., 2008).

### III.2.6. Validação do método cromatográfico

O método para determinação de CIP, ENR e SQX em extrato de HA, provenientes dos ensaios de sorção/dessorção, foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: efeito matriz, seletividade, faixa linear, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão intra e inter-dias.

A linearidade foi estabelecida por meio de curvas analíticas no extrato, em triplicata, em oito níveis de concentração, na faixa de 0,05 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado pela razão sinal/ruído. Para isso, soluções de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  fortificadas com os analitos foram injetadas em concentrações decrescentes do analito até razão sinal/ruído igual a 10.

Para avaliação da precisão, 20 mL (para CIP e ENR) e 2 mL (para SQX) de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  foi pré-equilibrada com uma massa de HA de 4 mg, sob agitação, por 12 h a 25 °C e, em seguida, fortificada com solução do fármaco em estudo a uma concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A mistura foi então agitada por um período de 48 h (tempo de equilíbrio aparente definido conforme procedimento descrito no **item III.2.5.4**). Em seguida, o extrato foi analisado pelo método HPLC-DAD-FLD desenvolvido. As análises foram realizadas em sextuplicata.

A precisão intra-dias foi realizada em sextuplicata no mesmo dia e a precisão inter-dias em três dias diferentes, sendo sextuplicata no primeiro dia e triplicata nos outros dois dias. Os resultados foram expressos pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*).

### **III.2.7. Isotermas de sorção e dessorção dos fármacos nos HA extraídos do solo**

Após definição da razão HA/solução (item III.2.5.3) e do tempo de equilíbrio aparente mais apropriados (48 h, III.2.5.4) foram realizados estudos para estabelecer as isotermas de sorção para cada HA (as isotermas foram construídas para os HA extraídos dos solos LVAd, LVe e RQo) e cada analito (CIP, ENR e SQX) em diversas condições do meio de sorção:

- i) Foi avaliado o efeito de mudanças no pH da solução de  $\text{CaCl}_2$ , na faixa de pH entre 3 e 7;
- ii) Foi estudado a influência da concentração de  $\text{CaCl}_2$  no coeficiente de sorção;
- iii) Foi calculado o coeficiente de sorção a partir da construção das isotermas em diferentes eletrólitos:  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ , KCl e NaCl. Neste estudo, as concentrações dos eletrólitos foram mantidas em  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . O estudo foi conduzido conforme o procedimento descrito.

Para a construção das isotermas de sorção, misturas de 20 mL (para ENR e CIP) e 2 mL (para SQX) de “solução de eletrólito” com uma massa de HA de 4 mg foram pré-equilibradas sob agitação, por 12 h. Em seguida, as misturas foram fortificadas em nove níveis de concentração do analito: 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 e  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , equivalentes a 2,5, 5,0, 12,5, 25,0, 37,5, 50,0, 75,0, 100,0 e  $150,0 \text{ mg g}^{-1}$  de HA (para CIP e ENR).

No estudo com a SQX, as amostras foram fortificadas na faixa de 250 a  $10000 \mu\text{g g}^{-1}$  de HA.

#### **III.2.7.1. Avaliação do efeito do pH no coeficiente de sorção**

As isotermas foram construídas, conforme anteriormente, utilizando 4 mg de cada amostra de HA pré-equilibrados, durante 12 h, com 20 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (para CIP e ENR) ou 4 mL (para SQX). Neste caso, o pH da

solução em contato com o HA foi ajustado para valores de pH de 3 a 7, usando HCl ou NaOH. Foi construída também uma isoterma no pH natural da solução do extrato de HA (pH 4,7). Em seguida, as misturas foram fortificadas como descrito anteriormente. Para cada nível de concentração, as análises foram realizadas em duplicata.

#### **III.2.7.2. Avaliação do tipo e concentração de eletrólito**

As isotermas foram construídas mantendo o pH natural do extrato de HA, alterando, contudo, a concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$  empregada. As concentrações avaliadas foram 0,001, 0,01, 0,05, e 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ .

Também, foram construídas isotermas de sorção utilizando outros tipos de eletrólitos. Neste caso, a solução de  $\text{CaCl}_2$  foi substituída por soluções de  $\text{BaCl}_2$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{KCl}$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$ .

#### **III.2.7.3. Isotermas de dessorção**

Para construção das isotermas de dessorção, a fase aquosa foi repostada com a solução de eletrólito correspondente, a cada amostra de HA remanescente do estudo de sorção, e as misturas permaneceram sob agitação por 56 h. Após este período, as misturas foram centrifugadas a 1860 g por 10 min e analisadas pelos métodos cromatográficos desenvolvidos.

#### **III.2.7.4. Modelagem das isotermas de sorção**

Para todas as isotermas de sorção realizadas, a quantidade de analito sorvida nos HA foi calculada pela diferença entre a quantidade de analito inicialmente presente na solução e a quantidade do analito remanescente ao final do experimento em solução (Equação 12).

$$C_s^{\text{ads}} = \frac{V_0}{m_{\text{HA}}} \times (C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}) \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde  $C_s^{\text{ads}}$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) é a concentração do analito sorvida no HA solido,  $C_0$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração inicial do analito em solução,  $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração remanescente do analito em solução,  $V_0$  (mL) é o volume inicial de solução e  $m_{\text{HA}}$  (g) é a massa do HA.

A quantidade de analito dessorvida também foi calculada de forma indireta (Equação 13), onde  $C_s^{\text{des}}$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) é a concentração do analito remanescente no HA e  $C_{\text{aq}}^{\text{des}}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração do analito dessorvida presente na solução.

$$C_s^{\text{des}} = C_s^{\text{ads}} - (C_{\text{aq}}^{\text{des}} \times \frac{V_0}{m_{\text{HA}}}) \quad (\text{Eq. 13})$$

Os valores de concentração de antimicrobiano presente no HA ( $C_s$ ) foram plotados em função dos valores de concentração de antimicrobiano presente em solução ( $C_{\text{aq}}$ ), após equilíbrio aparente ter sido atingido. As isothermas de sorção e dessorção foram então ajustadas ao modelo de Freundlich (Equação 14), que descreve a relação entre a densidade de sorção do composto e sua concentração de equilíbrio na fase líquida, assumindo heterogeneidade dos sítios de sorção.

$$C_s = K_F \cdot C_{\text{aq}}^{1/n} \quad (\text{Eq. 14})$$

Onde  $K_F$  ( $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$ ) é o coeficiente de sorção/dessorção de Freundlich e  $1/n$  é o expoente de Freundlich, constante que descreve a intensidade de sorção/dessorção.

### III.2.8. Estudo comparativo dos coeficientes de sorção

Para a comparação do potencial de sorção das FQ e SA nos diferentes HA, não foram construídas isothermas de sorção. Neste caso foram calculados os coeficientes de sorção ( $K_D$ ).

Este estudo foi realizado usando os HA extraídos dos sete solos coletados: HA-LVad, HA-LVe e HA-RQo, HA-RQ (N1), HA-LV (N2), HA-LVA (S1), HA-PVA (S2) e adicionalmente foram incluídos os HA: HA-OX(MS2), HA-OX(SC1),

HA-OX(SP1), HA-O(RJ2), HA-CH(MB4), HA-EK(RS1), HA-EK(RO), HA-SPB, HA-GM(PM)

Para o cálculo do  $K_D$  foram seguidas as orientações do guia da EPA (*Environmental Protection Agency, Understanding Variation in Partition Coefficient,  $K_D$ , values*).

Para tanto, misturas de 20 mL (para ENR e CIP) e 2 mL (para SQX) de solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  com uma massa de HA de 4 mg foram pré-equilibradas sob agitação, por 12 h a  $25^\circ\text{C}$ , e ao abrigo de luz. Em seguida, as misturas foram fortificadas em três níveis de concentração a 2,5, 5 e  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O estudo foi realizado conforme o procedimento descrito (III.2.4). As análises foram realizadas em triplicata.

A quantidade de analito sorvida nos HA foi calculada pela diferença entre a quantidade de analito inicialmente presente na solução e a quantidade do analito remanescente ao final do experimento em solução.

O coeficiente de distribuição  $K_{Di}$  de cada nível de concentração, foi calculado mediante a Equação 14, considerando  $1/n = 1$ . Finalmente, o  $K_D$  de cada experimento foi calculado como sendo a média dos valores de  $K_{Di}$  de cada nível de concentração.

### **III.3. Caraterização molecular dos HA e abordagem multivariada**

Nas posteriores análises de caracterização molecular foram incluídos tanto os HA extraídos dos solos coletados quanto os HA previamente extraídos e cedidos pela Embrapa.

#### **III.3.1. Espectroscopia por refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

As análises de infravermelho foram realizadas com acessório de ATR horizontal empregando um cristal de diamante. Todos os espectros foram obtidos em duplicata, na faixa de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e 64 varreduras. Antes de registrar os espectros de amostras foi obtido o espectro de infravermelho chamado “branco” empregando o cristal sem amostra.

Para a análise foi usado 5 mg de massa seca de HA (obtido após diálises por 3 dias para purificação e processo de liofilização por 2 dias).

#### **III.3.1.1. Tratamento de dados e análise multivariado**

O tratamento de dados: agrupamento hierárquico (HCA) e de análise de componentes principais (PCA) foi realizado utilizando o software computacional Pirouette Multivariate Data, versão 3.11.

#### **III.3.2. Espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS)**

A caracterização dos HA por FT-ICR MS. A ionização foi realizada por *electrospray* no modo negativo empregando as seguintes condições otimizadas: vazão de injeção da amostra, 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; voltagem da agulha, -3.6 kV; voltagem das lentes, -140 V e temperatura do capilar, 280 °C.

Os espectros de massas foram adquiridos pela coleta de 150 varreduras na faixa de  $m/z$  de 200 a 800. As amostras foram analisadas com resolução de 400.000 na  $m/z$  400 e o tempo total de aquisição dos espectros foi de aproximadamente 7 min. O controle de ganho automático (AGC, que corresponde ao número de cargas transferidas do *trap* linear de íons para a cela de ICR) foi configurado em  $5 \times 10^5$ .

##### **III.3.2.1. Desenvolvimento do método para análise dos ácidos húmicos por FT-ICR MS**

Foram avaliados três procedimentos de preparo das amostras. Estes testes preliminares foram realizados utilizando os HA-LVAd, HA-LVe e o HA-RQo e os resultados foram estendidos ao conjunto de HA em estudo.

- Procedimento A: 150 mg de massa úmida de HA (obtido após diálise por 3 dias para purificação) foi pesada e dissolvida em 10 mL de MeOH com 20% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
- Procedimento B: 10 mg de massa seca de HA (obtido após diálise por 3 dias para purificação e processo de liofilização por 2 dias) foi pesada e dissolvida



em 10 mL de MeOH com 20%v/v de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A mistura foi agitada durante uma noite.

- Procedimento C: 10 mg de massa seca de HA (obtido após diálise por 3 dias para purificação e processo de liofilização por 2 dias) foi pesada, dissolvida em 10mL de NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e agitada durante 12 horas. Após este período, 3 mL da solução foi percolada por resina de troca catiônica (Dowex, 50WX8 forma  $\text{H}^+$ ) e, então, foi coletado o material não retido no cartucho.

Uma alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  de cada solução obtida em cada procedimento foi diluída para 10 mL com uma solução de MeOH e  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% na proporção 1:1 (v/v) e analisada por infusão direta no ESI (-) FT -ICR MS.

### III.3.2.2. Tratamento de dados dos espectros FT -ICR MS

Os espectros de massas de ultra-alta resolução obtidos para os HA continham um número muito elevado de sinais, o que não permitiu a classificação e tratamento dos dados. Para contornar essa dificuldade, foi usado o software Xcalibur (versão 2.0) para realizar as etapas de recalibração interna dos espectros de massas e de atribuição das fórmulas moleculares. Adicionalmente, uma planilha de Excel com comandos de programação (macros) foi construída para realizar de forma automática as etapas de processamento de dados listadas a seguir:

i) Cálculo do limite sinal/ruído do espectro de massas e remoção dos dados com magnitude inferior a esse limite;

ii) Separação de informações redundantes, tais como valores de  $m/z$  de isotopólogos de  $^{13}\text{C}$  os quais podem ser atribuídos equivocadamente como íons monoisotópicos.

iii) Cálculo de parâmetros para cada fórmula molecular, tais como defeito de massa de Kendrick (KMD), razão de H/C, razão de O/C, DBE.

iv) Agrupamento e classificação das fórmulas moleculares e os parâmetros necessários para a construção de gráficos de van Krevelen, gráficos de classes de compostos e matrizes necessárias para os tratamentos quimiométricos.

### **III.3.2.2.1. Recalibração interna**

Os espectros de massas das HA foram recalibrados com os sinais da classe O10 com intensidade relativa maior que 10%. A fórmula molecular dos calibrantes foi determinada pelo melhor ajuste de todas as combinações possíveis de átomos contendo  $^{12}\text{C}$  (10-60),  $^1\text{H}$  (10-100) e  $^{16}\text{O}$  (0-1) e essas fórmulas foram verificadas pelo padrão isotópico do  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ . A recalibração interna e a atribuição das fórmulas moleculares foi realizada usando uma aplicação do software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific). Usualmente, após recalibração, os erros de massa das fórmulas moleculares atribuídas nos espectros de massas dos HA analisados neste estudo foram menores que 0,5 ppm.

### **III.3.2.2.2. Atribuição das fórmulas moleculares**

Para minimizar ao máximo o número íons com atribuições incorretas (falsos positivos) e o número de íons detectados no espectro não atribuídos (falso negativo) é necessário predefinir as combinações de átomos permitidas para a atribuição das fórmulas moleculares.

Neste estudo foi permitida a busca de fórmulas moleculares a partir de combinações de átomos de C (0-80), H (0-150), O (0-50), N (0-1) e S (0-1) com erro inferior a 1 ppm e magnitude acima de 3 vezes o desvio padrão da linha base do ruído (método do N-sigma, onde  $N=3$ ) (Zhurov et al., 2014).

Uma vez que não foi possível confirmar a presença, pelo padrão isotópico, de fórmulas moleculares contendo mais de um átomo de nitrogênio na estrutura, foi necessário uma restrição elementar considerando apenas moléculas com 0 e 1 átomo de nitrogênio em sua estrutura. As restrições elementares junto com a recalibração dos espectros permitiram atribuir uma única fórmula molecular para cada íon detectado nos espectros de massas dos HA.

---

---

## **IV. RESULTADOS**

---

---

A finalidade do presente trabalho foi examinar sistematicamente os mecanismos e os fatores-chave que controlam a sorção de antimicrobianos veterinários da família das fluoroquinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) e das sulfonamidas em ácidos húmicos extraídos de solos brasileiros.

Para tanto, inicialmente, foram realizados estudos de sorção e dessorção seguindo as recomendações do Guia OECD (OECD 106). Foram avaliados os aspectos cinéticos e termodinâmicos dos processos de sorção e a influência de diversos fatores no meio de sorção.

Adicionalmente, os ácidos húmicos extraídos de diferentes solos foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de ultra-alta resolução e foram propostos mecanismos de interação destes antimicrobianos com os ácidos húmicos considerando as características moleculares dos mesmos.

#### **IV.1. Coleta de solos e caracterização dos ácidos húmicos**

Neste trabalho, inicialmente, foram empregados ácidos húmicos extraídos de sete solos: Neossolo Quartzarênico, Latossolo Vermelho, Latossolo Vermelho Amarelo, Agissolo Vermelho Amarelo, Neossolo Quartzarênico Órtico, Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico e Latossolo Vermelho Eutrófico. As características físico-químicas e texturais de cada solo foram determinadas previamente no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e estão apresentadas na **Tabela 1**. Em geral estes solos apresentam um valor de pH medido no  $\text{CaCl}_2$  na faixa de 4 a 5.

**Tabela 1-** Propriedades físico-químicas e texturais dos solos coletados.

	<b>Nomenclatura SiBCS</b>	<b>MO, % m/m</b>	<b>CTC mmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup></b>	<b>SB mmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup></b>	<b>H + Al mmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup></b>	<b>Areia %</b>	<b>Silte %</b>	<b>Argila %</b>
<b>RQ (N1)</b>	<b>Neossolo Quartzarênico</b>	1,5	19,3	7,4	12	91,1	1,8	6,2
<b>LV (N2)</b>	<b>Latossolo Vermelho</b>	2,9	52,7	-	34	14,9	30,2	54,6
<b>LVA (S1)</b>	<b>Latossolo Vermelho Amarelo</b>	2,5	51,9	-	46	52,9	10,5	36,2
<b>PVA (S2)</b>	<b>Argissolo Vermelho Amarelo</b>	3,2	66,0	15,8	50	43,5	7,0	49,2
<b>RQo</b>	<b>Neossolo Quartzarênico Órtico</b>	0,4	24,2	1,2	23	93,2	1,7	5,1
<b>LVAd</b>	<b>Latossolo Vermelho Amarelo distrófico</b>	1,3	65,2	19,2	46	50,5	8,2	40,9
<b>LVe</b>	<b>Latossolo Vermelho eutróficos</b>	1,3	66,4	35,4	31	27,4	12,4	60,2

CTC: capacidade de troca catiônica; MO: teor de matéria orgânica; mmol<sub>c</sub>: milimol de carga; SB: soma de bases, H + Al: acidez potencial dos solos. Para os solos LV (N2) e LVA(S1) não foram fornecidos os valores de SB.

Os solos do tipo Argilossolos vermelho-amarelos cobrem 41,2% da superfície do estado de São Paulo, os Latossolos Vermelhos 30,2%, Latossolos Vermelho Amarelos 9,4% e os Neossolos Quartzarênicos 3,6%. Portanto, os sete solos coletados para o desenvolvimento deste trabalho são representativos de mais de 84% da superfície do estado (Benedetti et al., 2011; Embrapa, 2013).

#### IV.2. Extração e análise elementar dos ácidos húmicos

Para avaliar a influencia dos HA no processo de sorção dos antimicrobianos veterinários, primeiramente, foi necessária a extração dos HA dos solos.

Os HA foram extraídos dos diferentes tipos de solos utilizando o protocolo proposto pela IHSS e cujo procedimento está descrito em III.2.1. Após a extração os HA foram liofilizados e estocados em temperatura ambiente até serem usados nos experimentos de sorção e caracterização.

Na **Tabela 2** apresentam-se os resultados correspondentes ao teor dos HA de cada solo, composição elementar dos HA e as razões atômicas (H/C, O/C e C/N) calculadas.

**Tabela 2** - Análise da composição elementar dos ácidos húmicos.

Amostras	Teor de HA, g kg <sup>-1</sup>	C(%)	H(%)	N(%)	O(%)	H/C	O/C	C/N
HA-RQo	3	36,1	4,4	3,0	56,4	1,5	1,2	14,0
HA-LVAd	14	43,6	4,9	3,7	47,7	1,3	0,8	13,6
HA-LVe	6	49,2	4,8	4,1	41,9	1,2	0,6	14,0
HA-RQ(N1)	3	44,3	4,3	3,8	47,6	1,2	0,8	13,7
HA-LV(N2)	5	44,7	4,8	3,9	46,6	1,3	0,8	13,4
HA-LVA(S1)	8	43,8	4,6	3,4	48,1	1,3	0,8	14,9
HA-PVA(S2)	12	23,0	3,1	1,6	30,3	1,6	1,0	16,5

O teor de HA extraídos dos solos avaliados foi na faixa de 0,3 - 1,4% m/m, sendo que os Latossolos PVA (S2) e LVAd são os solos que possuem o maior teor de HA; estes HA correspondem a solos com elevados valores de CTC e possuem uma porcentagem média de argila de 50%.

Nos HA extraídos o teor de carbono (%C) variou entre 23 e 49%, o hidrogênio entre 3 e 5%, o nitrogênio entre 2 e 4% e o oxigênio entre 30 e 56%. Entretanto, comparando os resultados da análise elementar destes HA com os da coleção da IHSS (IHSS, 2014) observa-se que os valores de oxigênio são superiores e os de carbono inferiores aos tabelados. No entanto, uma série de trabalhos com HA provenientes de solos de clima tropical (Canellas et al., 2000; Dobbss et al., 2009; Kotzerke et al., 2008) têm apresentado valores de C menores do que a faixa indicada e muito próxima da faixa normalmente encontrada para ácidos fúlvicos, que varia de 35 a 75%.

Uma maior relação H/C ( $> 1,2$ ) do HA extraído do solo RQo, PVA(S2) indica maior contribuição de componentes alifáticos e provavelmente substâncias húmicas de baixa massa molecular, comparado com a provável presença de compostos aromáticos, com maior condensação ou instauração dos HA LVAd e LVe. Destaca-se que a natureza polar das pequenas moléculas de HA poderia facilitar a sorção e o transporte de contaminantes polares (Hayes et al., 2001).

A relação O/C  $> 1,0$  reflete a maior quantidade de grupos funcionais oxigenados, como COOH e carboidratos predominante nos RQo, PVA(S2).

Cabe destacar que uma razão relativamente elevada de O/C e H/C nos HA do solo PVA(S2) (Argissolo Vermelho-Amarelo) e RQo sugere que estas substâncias húmicas foram submetidas a um baixo grau de condensação aromática e são consideravelmente mais alifáticas de natureza.

No entanto, a avaliação indireta da aromaticidade-alifaticidade deve ser feita com cuidado, pois as insaturações presentes em grupos carboxílicos e carbonilas primárias são levadas em conta durante os cálculos da relação H/C, não estando envolvidas na aromaticidade e alifaticidade das substâncias húmicas. A caracterização dos HA foi complementada com as análises de  $^{13}\text{C}$  NMR e espectrometria de massas de ultra-alta resolução, cujos resultados serão discutidos a seguir.

Observa-se, também, como característica predominante um elevado teor de N conferindo aos HA uma baixa razão C/N, sendo que na literatura esta, também, é uma característica de materiais bastante humificados. A humificação é um mecanismo natural que permite sequestrar o nitrogênio no solo nas formas mais refratárias da matéria orgânica para protegê-lo contra a perda por lixiviação ou

outros mecanismos (Cunha et al., 2009; Dobbss et al., 2009; Nascimento et al., 2010).

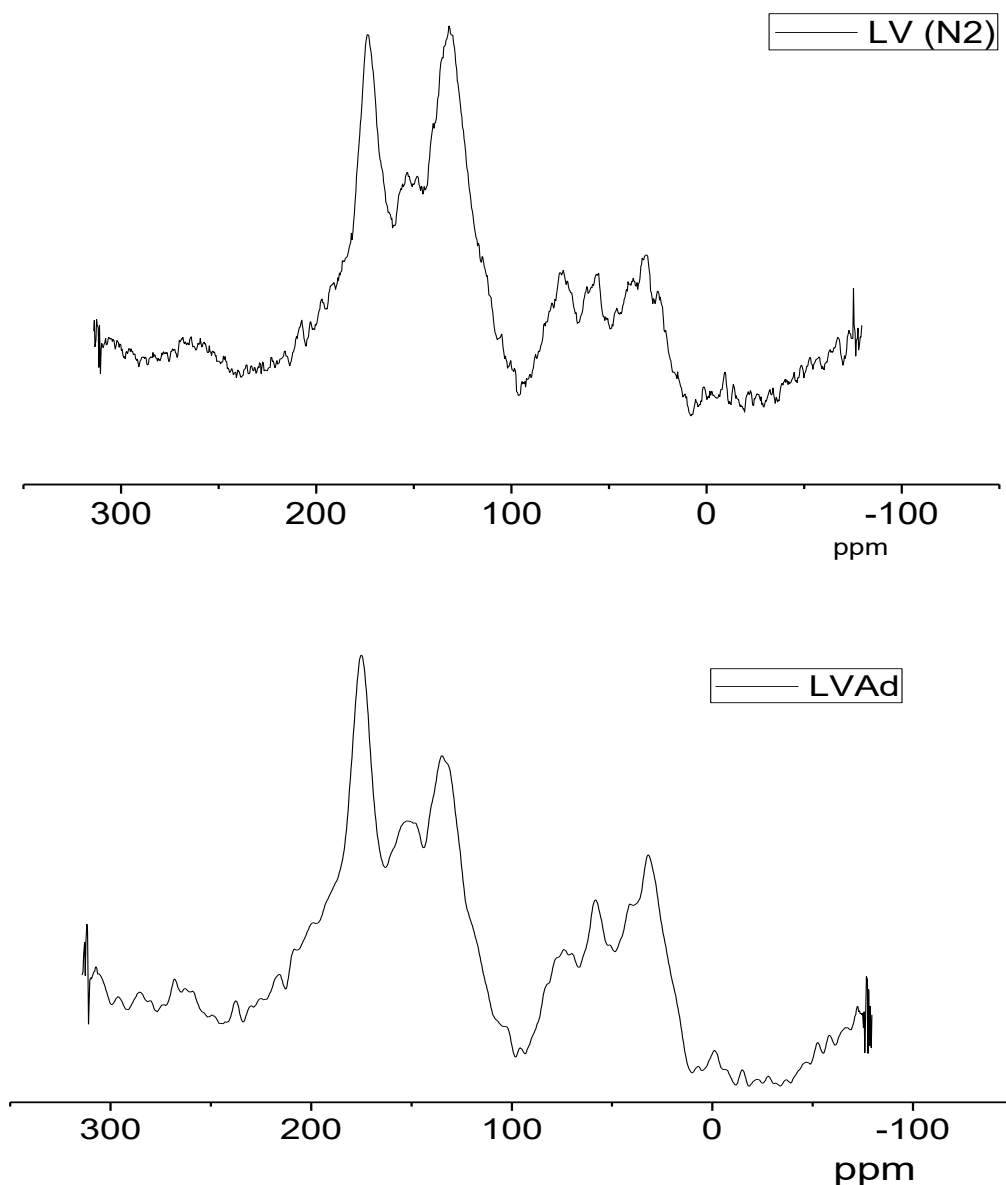
#### **IV.3. Caraterização dos HA usando ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido**

Com o intuito de conseguir elucidar o processo de sorção das FQ e SA com os HA a nível molecular, foi necessário avaliar as caraterísticas químicas dos HA, que são misturas complexas de compostos químicos.

Como foi descrito na introdução para descrever as caraterísticas químicas e moleculares de misturas complexas é necessário o uso em conjunto de diversas técnicas analíticas. Assim, se procedeu, primeiramente, a análise dos HA por  $^{13}\text{C}$  NMR.

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR de todas as amostras avaliadas tiveram um perfil semelhante. A título de exemplo são apresentados os espectros para as amostras HA-LV(N2) e HA-LVAd (**Figura 6**). No **Anexo 1** são apresentados os espectros  $^{13}\text{C}$  NMR de todas as amostras analisadas. De modo geral, os espectros apresentam uma baixa resolução.





**Figura 6** - Espectros usando a técnica de  $^{13}\text{C}$  NMR para os HA-LV(N2) e HA-LVAd extraídos dos solos coletados.

A atribuição dos sinais e a sua interpretação foi feita com base em estudos de NMR de material vegetal e matéria orgânica natural publicados por diversos autores (Al-Faiyz, 2013; ŠMejkalová et al., 2008). Para as análises dos dados, os espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR dos HA foram divididos em cinco regiões de acordo com seus grupos funcionais orgânicos.

A integração dos sinais correspondentes a cada região foi realizada com auxílio do software Mnova 9.0 e expressos como percentagens da área total (Zhang

*et al.*, 2012). Além disso, foram calculados os índices de polaridade (IP), de aromaticidade (IA) e de hidrofobicidade (IH). Estes índices foram calculados conforme descrito nos trabalhos de Hatcher et al. (1981) e Alcântara et al. (2004). Os resultados estão compilados na **Tabela 3**.

Embora os espectros fossem muito semelhantes visualmente ao se calcular às áreas referentes a cada grupo funcional relatado na **Tabela 3** pode se identificar pequenas diferenças entre as amostras analisadas.

Destacam-se as características do espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR do HA do solo LVAd. A alta intensidade de sinal entre 161-140 ppm é um indicativo do alto teor de moléculas com que contém grupos fenólicos e de estruturas que se assemelham a taninos e ligninas (fenólicos, O-arilo). Portanto, o solo LVAd possui o HA com maior IP.

As estruturas alifáticas são predominantes em HA com menos sinais de humificação e correspondem aos HA do solo RQo.

Sinais intensos na faixa de 210-161 ppm nos HA do solo PVA(S2) e RQo permitem caracterizar estes HA como moléculas contendo abundantes sítios ácidos doadores de prótons.

Cabe ressaltar que os HA extraídos do solo LVe se caracterizam por apresentar maior conteúdo de grupos aromáticos do que os HA dos solos LVAd e RQo.

Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos nas análises elementares. Os altos valores da fração atômica C/H e O/C do HA RQo estão em concordância com as características descritas nos espectros de NMR, apontando este HA como uma mistura de moléculas de características alifáticas e rica em grupos funcionais contendo oxigênio, tais como carboxilatos (**Tabela 2** do item **III.2.2.1**).

**Tabela 3** - Integração das áreas correspondentes aos grupamentos funcionais por meio da análise de  $^{13}\text{C}$  NMR nos HA extraídos dos solos coletados no estado de São Paulo.

Amostra	Região do espectro $^{13}\text{C}$ NMR (ppm)						IP	IA	IH
	Carboxílico / N- C=O	Fenólico C-O	Aromático	O-Alquila	N-Alquila, metoxila	Alquila C- alifático			
	210-161	161-140	140-107	95-65	65-45	45-0			
HA-LVAd	33,9	21,2	25,6	1,4	5,1	12,8	1,6	0,6	1,0
HA-LVe	28,2	12,4	36,5	4,0	6,5	12,6	1,0	0,7	1,4
HA-RQo	34,8	12,3	21,7	2,7	6,3	22,1	1,2	0,4	1,1
HA-PVA (S2)	35,3	14,3	36,9	1,1	3,3	9,1	1,1	0,7	1,2
HA-LV (N2)	33,0	18,9	41,9	1,0	1,2	4,0	1,2	0,9	1,3
HA-LVA (S1)	19,9	6,5	48,4	6,0	6,7	12,5	0,5	0,7	2,3

IP: Índice de polaridade, IA: Índice de aromaticidade, IH: Índice de hidrofobicidade.

#### **IV.4. Estudos de sorção dos fármacos nos HA**

De acordo com as recomendações do Guia 106 da OECD é possível estimar a extensão da sorção de uma substância com as partículas de um sorvente (neste caso, os HA), no equilíbrio, usando o coeficiente de sorção (OECD 106, 2000).

#### **IV.5. Estudos preliminares e cinéticas de adsorção dos antimicrobianos nos HA extraídos**

Seguindo as recomendações do Guia 106 da OECD, a avaliação da capacidade de sorção de um fármaco numa matriz sólida como os HA pode ser realizada baseada em medidas indiretas, na qual a quantidade sorvida da substância é calculada como a diferença entre a concentração inicial na solução e a concentração na solução após o processo de sorção.

O método indireto proposto pelo Guia exige que estudos preliminares sejam realizados, incluindo avaliar: i) o efeito matriz do extrato na quantificação do fármaco, ii) a estabilidade do fármaco em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup> durante o período de estudo, bem como iii) a possibilidade de sorção do analito nos frascos empregados.

O delineamento destes estudos e os resultados estão apresentados e discutidos a seguir. Estes testes preliminares foram realizados usando apenas os HA extraídos dos solos LVAd, LVe e RQo, sendo que os resultados foram estendidos aos outros tipos de solos em análise. A escolha destes solos foi baseada no fato que além de serem tipos de solos representativos do estado de São Paulo, estes três solos abrangeram desde solos com baixíssimos teores de TOC, CTC e argila até solos com altos teores destes parâmetros (Santos et al., 2013).

##### **IV.5.1. Avaliação da estabilidade do fármaco e efeito matriz do método HPLC- FLD**

A avaliação do efeito matriz permite verificar possíveis interferências na quantificação dos analitos, causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral.

O efeito matriz pode provocar, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental. A importância de avaliar o efeito matriz, bem como a estabilidade do fármaco no extrato antes de realizar os estudos de sorção é fundamentada no fato de que a quantidade sorvida nos HA é determinada indiretamente. O efeito matriz, quando presente e não eliminado pode levar a uma superestimação do coeficiente de sorção. Cabe destacar que a grande maioria dos trabalhos publicados na literatura não faz menção ao estudo de efeito matriz, embora este seja uma avaliação obrigatória, segundo o Guia 106 da OECD.

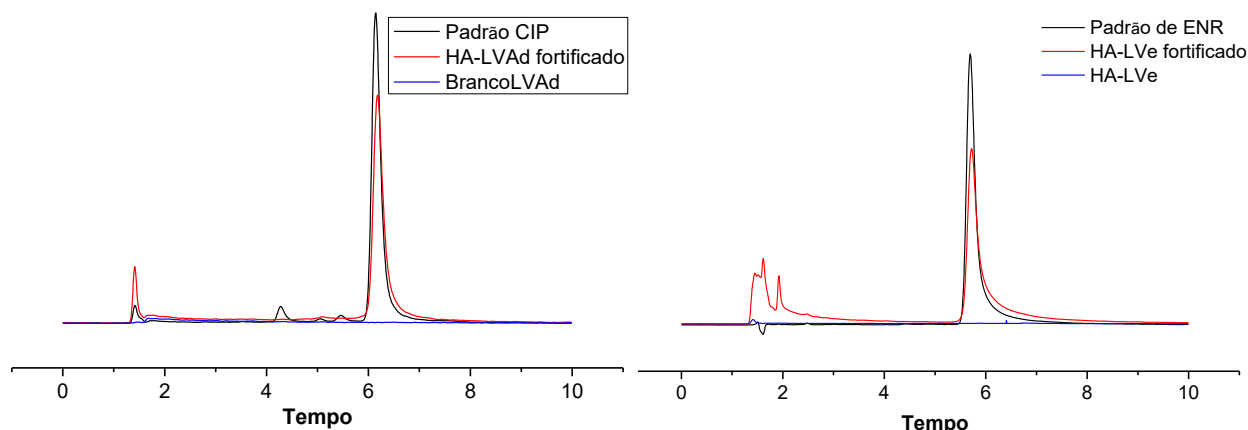
Para avaliação da estabilidade e/ou possível adsorção dos fármacos nos frascos foram realizadas análises das amostras controle, ou seja, de amostras contendo o analito em  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Estas análises mostraram que não houve adsorção dos fármacos nos frascos de polipropileno utilizados nos ensaios. Para a análise de SQX, foram empregados frascos de vidro, uma vez que já tinha sido verificada adsorção desta substância nas paredes dos frascos de polipropileno em estudos anteriores (Doretto et al., 2014). Além disso, os fármacos se mantiveram estáveis em solução aquosa durante 60 horas nas condições empregadas. As análises das amostras branco, amostras de solo em  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , mostraram que não houve a presença dos fármacos em estudo nos solos empregados, em valores acima dos limites de detecção dos métodos.

Para avaliação do efeito matriz ou possível diminuição do sinal analítico causada por interação com a matriz, extratos obtidos de HA dos solos RQo, LVAd e LVe em solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foram fortificados e analisados por HPLC-FLD e as concentrações obtidas comparadas estatisticamente com a concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  fortificada no mesmo nível de concentração.

A avaliação dos cromatogramas (**Figura 7**) permitiu evidenciar a forte interação dos componentes solúveis dos HA com as FQ avaliadas. Este efeito leva a em alguns casos, até 30% de supressão da área no tempo de retenção do analito de interesse. Adicionalmente, verifica-se a eluição de compostos polares em 1 a 2 minutos da corrida cromatográfica.

CIP no HA-LVAd

ENR no HA-LVe



**Figura 7-** Cromatogramas de CIP e ENR em solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e nos extratos dos HA do solo LVAd (para a CIP) e LVe (para a ENR) (razão de 4 mg de HA para 10 mL de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ). A concentração de ENR e CIP foi de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 Zorbax Eclipse Plus a  $40^\circ\text{C}$ , fase móvel metanol:ácido fórmico 0,1% 70:30 (v/v), no modo isocrático, vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção de  $10 \mu\text{L}$  e comprimento de onda emissão e excitação de 277 nm e 440 nm, respectivamente.

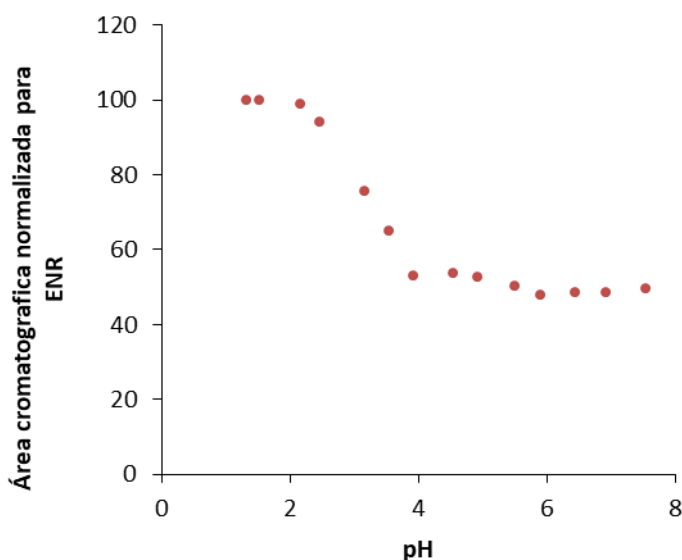
Alguns estudos foram realizados a fim de minimizar esse efeito de diminuição do sinal analítico para, então, dar continuidade aos estudos de sorção. Em trabalho anterior, já tinha sido verificado esse fenômeno em estudos de sorção de norfloxacin em solos (Peruchi, et al., 2015) e foi verificado que por controle de pH ou adição de EDTA ao extrato esse problema de efeito matriz pode ser contornado. Uma vez que no presente trabalho o estudo de sorção é com HA e não com o solo, também foram avaliados a influência do pH do meio e/ou adição de EDTA no formato e área do pico cromatográfico.

O efeito da mudança no pH no extrato de HA pode ser observado na **Figura 8**. Neste gráfico foram plotadas as áreas cromatográficas correspondentes a ENR (também foi realizada avaliação da pureza do pico cromatográfico) em função do valor de pH ajustado. A concentração de ENR foi de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A partir deste estudo é possível concluir que a supressão do sinal da ENR é fortemente dependente do pH do extrato de HA. Quanto menor o pH, maior é

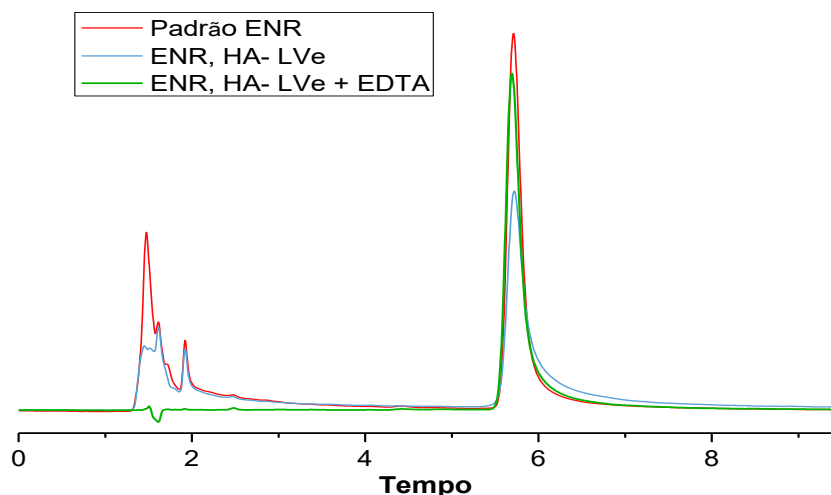
o sinal cromatográfico da ENR, sugerindo que a molécula encontra-se livre em soluções com pH baixos. O mesmo comportamento foi observado para a CIP.

A influência do pH neste fenômeno de supressão do sinal analítico no extrato dos HA é provavelmente resultado da mudança das cargas elétricas da matéria orgânica solúvel do extrato e do fármaco em solução. Em pH baixos, os HA são menos solúveis e estão na forma protonada, assim como a ENR, diminuindo sua possibilidade de interação em solução. Em pH acima de 4, a ENR se encontra predominantemente na forma zwitteriônica o que favorece sua interação com a matéria orgânica com carga negativa, levando a diminuição do sinal analítico da ENR livre.



**Figura 8** - Efeito do pH na resposta cromatográfica obtida para a ENR na análise do extrato fortificado do HA-LVAd.

Sendo assim, foi avaliado o efeito da adição de EDTA, um agente quelante, ao extrato comparando-se a área do pico cromatográfico obtido de uma solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  contendo o analito (CIP ou ENR) na concentração de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  com soluções do analito preparadas no extrato equilibrado de HA com adição de diferentes concentrações de EDTA. Com os resultados obtidos (**Figura 9**), foi possível concluir que o efeito matriz causado pelos componentes dos HA extraídos na determinação de FQ nos extratos foi praticamente eliminado, tornando a adição de EDTA uma boa estratégia para ser utilizada nos estudos de sorção e dessorção das FQ nos HA.



**Figura 9** - Cromatogramas de ENR em solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , no extrato do HA-LVe (razão de 4 mg de HA para 10 mL de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) fortificado com ENR e no extrato fortificado com ENR e adição de EDTA. A concentração de ENR foi de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Condições cromatográficas: coluna C18 Zorbax Eclipse Plus a  $40^\circ\text{C}$ , fase móvel metanol:ácido fórmico 0,1% 70:30 (v/v), no modo isocrático, vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção de  $10 \mu\text{L}$  e comprimento de onda emissão e excitação de 277 nm e 440 nm, respectivamente.

Estes resultados estão em conformidade com as observações de Peruchi et al (2015) e corroboram outros da literatura que indicam a facilidade das FQ em formar complexos estáveis com cátions metálicos di-trivalentes através de uma interação íon-dipolo com o oxigênio do grupo cetona e o grupo carboxila ionizado, interações facilitadas em um meio ácido (Uivarosi, 2013). É possível, que no meio de sorção em estudo, as concentrações de cálcio permitam este tipo de interações. Por outro lado, o pH do meio também pode facilitar a complexação do grupo quinolínico das FQ com os HA solúveis causando o decréscimo do sinal analítico para ENR e CIP (Milne et al., 2001; Ritchie and Perdue, 2003).

No caso da SQX, não foi evidenciado efeito de supressão do sinal, ou seja, não houve efeito matriz.



#### IV.5.2. Avaliação da razão ácido húmico/ solução de $\text{CaCl}_2$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$

Para estabelecer a melhor razão de HA: solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  foram avaliadas as seguintes proporções: 1:2500, 1:5000 e 1:10000 m/v.

A porcentagem de sorção de ENR nos HA foi de 67 a 84%, usando uma razão de HA: solução 1:2500 m/v, de 56 a 72%, com usando razão 1:5000 m/v e de 29 a 45%, para razão 1:10000 m/v. Apesar de todas as proporções testadas terem resultado em valores de sorção superiores a 20%, como recomendado pelo Guia 106 da OECD, a razão 1:5000 m/v (4 mg de HA em 20 mL de  $\text{CaCl}_2$ ), que proporcionou uma porcentagem de sorção de ENR superior a 50% em todos os tipos de HA avaliados, foi escolhida para os experimentos subsequentes. Esta foi também a melhor condição para quantificar ENR nas soluções provenientes dos estudos de dessorção, já que esta razão possibilitou manter a concentração de analito na fase aquosa alta o suficiente (maior que o LOQ 5 ng  $\text{mL}^{-1}$ ) para ser medida com precisão e exatidão.

Fazendo uso desta mesma proporção (1:5000 m/v), a porcentagem de sorção da CIP nos HA, foi de 43%, 34% e 51%, para os solos LVAd, RQo e LVe, respectivamente.

Os valores das porcentagens de sorção dos fármacos nos HA foram comparados com os valores obtidos ao se avaliar a sorção destes compostos nos solos (considerando o solo completo, ou seja, sem extração da matéria orgânica). Para se obter uma porcentagem de sorção de CIP e ENR em solos superiores a 50%, a razão deve ser de 1:180 m/v (0,5 g de solo em 90 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), que comparada com a razão de 1:5000 m/v (4 mg de HA em 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), reflete a alta quantidade de sítios ativos de alta energia disponíveis para interação nos HA.

Já a SQX apresenta um comportamento diferente das FQ. No pH do solo (pH 4,7), a molécula se encontra na forma neutra, de maneira que as interações esperadas são de tipo hidrofóbicas, como já relatado em trabalho anterior de Doretto et al. (2014). Em estudos de sorção de SQX em solo, a razão solo:solução 1:5 m/v resultou em porcentagem de sorção de 50% (Doretto et al., 2014).

Neste trabalho foram estudadas cinco diferentes razões HA:solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  para SQX, sendo que a razão mais adequada para os estudos de

sorção foi de 4 mg de HA para 2 mL de solução. A porcentagem de sorção no tempo de equilíbrio aparente (48 horas) foi de 50,7 % no HA do solo LVAd, utilizando esta razão.

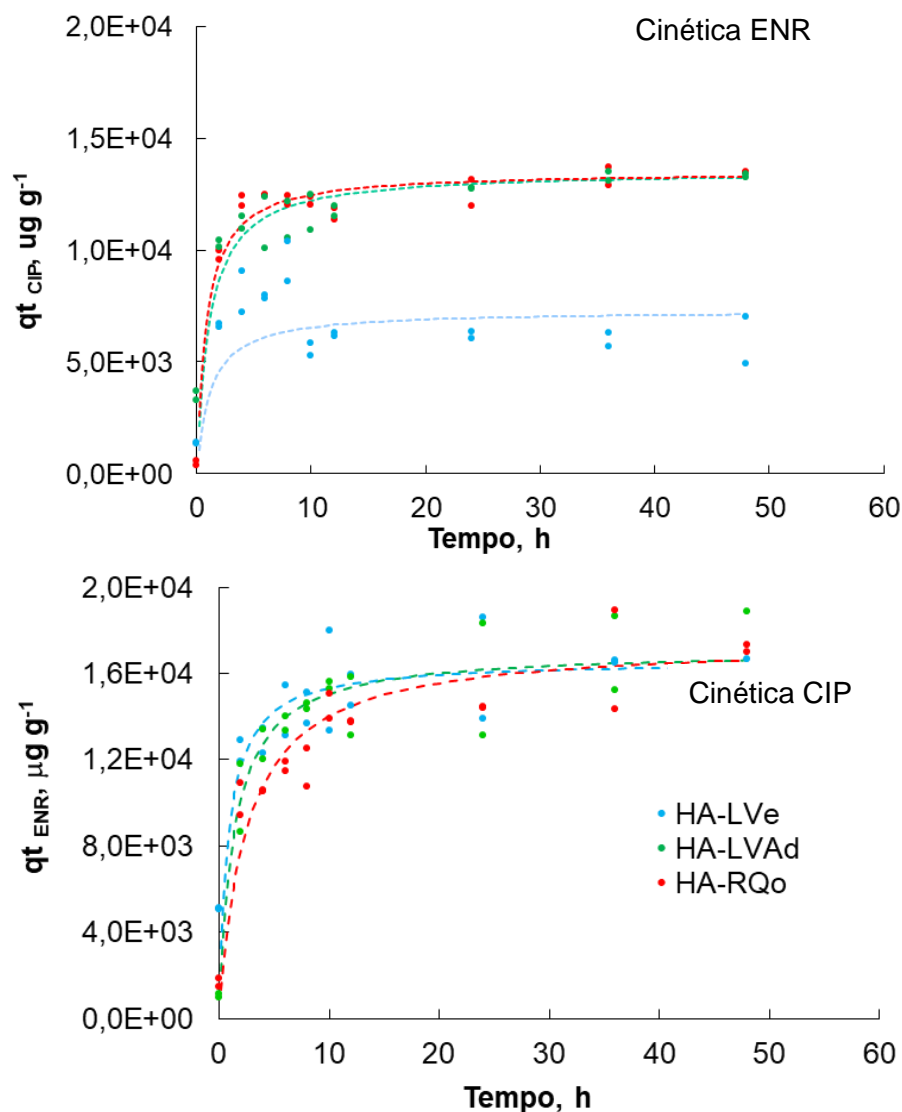
#### **IV.5.3. Cinéticas de sorção dos fármacos nos HA (tempo de equilíbrio aparente)**

Para a realização dos estudos de sorção, os tempos de equilíbrio aparente foram estabelecidos por meio dos resultados da quantidade de analito sorvida *versus* o tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h). A concentração inicial de analito em contato com o HA foi de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (25,0 mg  $\text{g}^{-1}$  de fármaco no HA, para CIP e ENR, e 2,5 mg  $\text{g}^{-1}$  para SQX). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A cinética de sorção das FQ nos HA caracterizou-se por duas fases distintas: uma sorção rápida na fase inicial, nas quatro primeiras horas, seguida por uma fase lenta (**Figura 10**). Essa tendência foi observada em todos os HA avaliados, sendo que o equilíbrio foi atingido em 36 h para todos os sorventes.

O formato característico da curva cinética de sorção é determinado pelos sítios de sorção disponíveis, indicando que no início há um grande número de sítios de sorção superficiais disponíveis na estrutura dos HA e, na fase seguinte, os sítios superficiais vagos são difíceis de serem ocupados devido às forças de repulsão entre as moléculas do soluto na fase sólida e as moléculas em solução (Plazinski et al., 2013; Zhang et al., 2012).

Pan et al. (2012) avaliaram a cinética de sorção da ofloxacina em solos com diferentes teores de carbono orgânico, bem como em componentes de solo, tais como HA, óxido de ferro e caulinita. Os autores sugerem que a sorção rápida de ofloxacina ocorre em sítios de alta energia (por exemplo, as hidroxilas e os grupos carboxila expostos) e atinge a saturação com o aumento da carga de ofloxacina.



**Figura 10** - Cinéticas de sorção de ENR e CIP nos HA-LVad, HA-LVe e HA-RQo.

Os resultados das cinéticas para ENR e CIP foram modelados pelas equações de pseudo-primeira-ordem, pseudo-segunda-ordem e Elovich, todas na forma linear. Os dados obtidos experimentalmente confirmaram as interpretações teóricas descritas na literatura. A equação de pseudo-segunda-ordem (PSO) é capaz de representar a cinética de sorção da maioria dos sistemas (Plazinski et al., 2009). Baseando-se nos coeficientes de correlação apresentados na **Tabela 4**, o modelo de PSO foi o que melhor explicou os dados experimentais de sorção da ENR e CIP nos três HA ( $r > 0,98$ ).

A partir dos valores da constante de velocidade ( $k_2$ ), obtidos por meio da aplicação do modelo de PSO, pôde-se constatar que a sorção de ENR e CIP foi mais rápida nos HA provenientes do solo LVe. Para a molécula de ENR, a

velocidade de sorção foi maior nos HA extraídos do solo LVAd do que do solo RQo, enquanto para a CIP, as velocidades de sorção foram iguais nos HA dos solos LVAd e RQo. Foram evidenciadas diferenças no comportamento de CIP e ENR, sendo que a única diferença estrutural destas moléculas é o substituinte N-etil do grupo piperazinil na molécula de ENR.

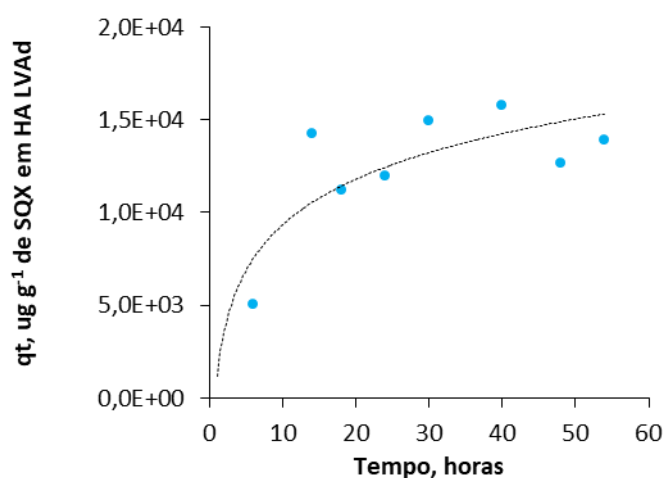
Nos estudos reportados por Peruchi et al. (2015) sobre o comportamento de sorção da NOR, em conjunto com os resultados reportados para ENR e CIP por Vieira e Fostier (2016) em solos, a tendência observada foi de uma cinética de sorção mais rápida em solos com um maior conteúdo de argila e mais lenta em solos com maior conteúdo de areia. Entretanto, para identificar características estruturais que ditam o comportamento da cinética de sorção da ENR e CIP nos HA extraídos do solo é necessário realizar estudos de caracterização estrutural destes.

**Tabela 4** - Parâmetros cinéticos de sorção dos fármacos avaliados nos HA.

	<b>Elovich</b>			<b>Pseudo-primeira-ordem</b>			<b>Pseudo-segunda-ordem</b>		
	$qt = (1/Y)\ln(t) + (1/Y)\ln(XY)$			$\log(q_e - qt) = \log q_e - k_1/2,303 t$			$t/qt = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e$		
	$(1/Y)\ln(XY)$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$1/Y$ ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	$r$	$q_e$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$k_1$ ( $\mu\text{g}^{-1} \text{g min}^{-1}$ )	$r$	$q_e$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$r$
<b>Ciprofloxacilina</b>									
<b>HA-LVAd</b>	8658	518	0,75	4847	$3,1 \times 10^{-3}$	0,58	13541	$1,14 \times 10^{-6}$	0,997
<b>HA-RQo</b>	10141	435	0,20	2580	$5,3 \times 10^{-5}$	0,15	13516	$1,48 \times 10^{-6}$	0,998
<b>HA-LVe</b>	-267	1071	0,56	1306	$1,1 \times 10^{-3}$	0,29	7292	$2,00 \times 10^{-6}$	0,980
<b>Enrofloxacin</b>									
<b>HA-LVAd</b>	1714	1978	0,78	5260	$5,0 \times 10^{-4}$	0,21	17069	$0,73 \times 10^{-6}$	0,985
<b>HA-RQo</b>	-1734	2339	0,85	7094	$8,2 \times 10^{-4}$	0,54	17454	$0,39 \times 10^{-6}$	0,979
<b>HA-LVe</b>	6057	1363	0,71	4892	$1,4 \times 10^{-3}$	0,45	16584	$1,22 \times 10^{-6}$	0,991
<b>Sulfaquinoxalina</b>									
<b>HA-LVAd</b>	1074	0,129	0,36	882	$6,9 \times 10^{-4}$	0,2980	1558	$6,42 \times 10^{-4}$	0,965

Foi possível observar, ainda, uma maior concentração sorvida das FQ no equilíbrio ( $q_e$ ) nos HA extraídos dos solos LVAd = RQo > LVe. Esta tendência poderia estar correlacionada com os valores de acidez potencial dos solos (H + Al, ver Tabela 1), sendo que este parâmetro está relacionado a um maior conteúdo de matéria orgânica humificada (Stürmer et al., 2011).

O gráfico da cinética de sorção da SQX difere das FQ pelo fato de que no início a sorção é moderada até atingir o patamar, ou seja, o pseudo-equilíbrio. A cinética de sorção da SQX é apresentada na **Figura 11**.



**Figura 11** – Gráfico de cinética de sorção. Representa a quantidade de SQX sorvida nos HA extraídos do solo LVAd em função do tempo.

Para determinar o tempo de equilíbrio de dessorção aparente, a quantidade de ENR dessorvida foi medida após 48 h, 56 h e 72 h. Não foram observadas diferenças na quantidade de ENR dessorvida nestes três tempos, indicando que um equilíbrio de dessorção aparente foi atingido após 48 h. Para a construção das isotermas de dessorção, para garantir o equilíbrio é por facilidade experimental adotou-se o período de 56 h, em que a porcentagem de ENR dessorvida foi de aproximadamente 18%, 20% e 18% para os HA dos solos LVAd, LVe e RQo, respectivamente.

#### IV.6. Validação do método de quantificação dos analitos por HPLC-DAD-FLD

Os métodos desenvolvidos para a quantificação de CIP, ENR e SQX em soluções de HA foram validados considerando os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, limite de quantificação e precisão intra- e inter-dias.

Cabe ressaltar que a diretriz do Guia 106 da OECD não apresenta um procedimento padrão de validação do método. Portanto, os parâmetros foram selecionados considerando o objetivo do método de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de sorção/dessorção.

Os resultados da regressão linear para os fármacos foram obtidos por meio de curvas analíticas ( $n=3$ ) em oito níveis de concentração. Os limites de quantificação (LOQ), que foram estabelecidos na razão sinal/ruído de 10, e a precisão intra-dia ( $n=6$ ) e inter-dias ( $n=12$ ) são apresentados na **Tabela 5**. A linearidade do método na faixa de 0,1 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  é expressa pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ) da curva obtida a partir do método dos mínimos quadrados ordinários.

**Tabela 5** - Resultados dos parâmetros de validação do método de quantificação dos fármacos em soluções de HA.

Fármaco	HA	Linearidade ( $r$ )	Sensibilidade (sinal/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	
					Intra-dias	Inter-dias
CIP	LVAAd	0,999	$104 \times 10^6$	5	11,0	13,8
	LVe	0,998	$83 \times 10^6$	5	-	-
	RQo	0,998	$124 \times 10^6$	5	-	-
ENR	LVAAd	0,999	$124 \times 10^6$	10	6,3	11,7
	LVe	0,998	$117 \times 10^6$	10	3,8	11,1
	RQo	0,998	$176 \times 10^6$	10	10,1	13,7
SQX	LVAAd	0,996	58	100	-	-

Os valores limites aceitáveis para cada parâmetro também não são especificados pelo Guia 106 da OECD. No entanto, os resultados foram considerados adequados ao objetivo que se propõem.

#### **IV.7. Isotermas de sorção e dessorção nos HA dos solos avaliados**

As isotermas de sorção são equações matemáticas usadas para descrever, em termos quantitativos, a sorção de solutos por sólidos, em temperaturas constantes. Neste caso, a isoterma mostra a quantidade de composto sorvido e dessorvido por grama de HA, em função da concentração de analito em contato direto com os HA.

Após definidas as condições experimentais, como razão HA:solução e o tempo de equilíbrio aparente foram conduzidos os estudos para estimar os coeficientes de sorção de FQ (ENR e CIP) e SA (SQX) nos HA extraídos do solo.

As isotermas de sorção e posterior modelagem foram construídas para os HA extraídos dos solos LVAd, LVe, RQo, RQ(N1), LV(N2).

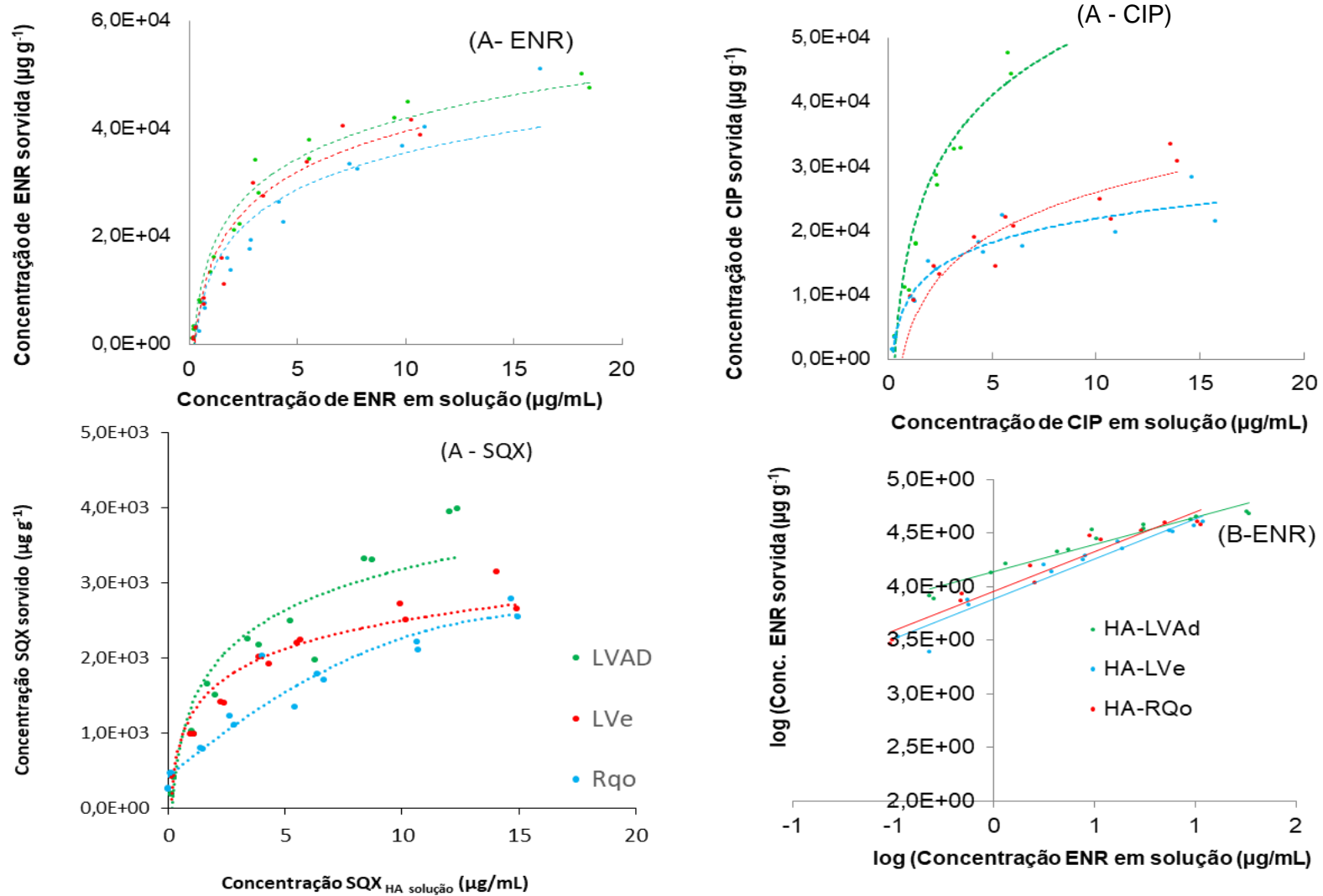
Para gerar os dados das isotermas de sorção, foram usadas concentrações de fármaco em contato direto com os HA na faixa de 2 a 150 e de 5 a 150 mg g<sup>-1</sup>, para as FQ e SQX, respectivamente.

Os gráficos do modelamento das etapas de sorção e dessorção de ENR nos solos LVAd e RQo estão apresentados na **Figura 12**.

O formato da curva da isoterma obtida é o denominado “formato L”. A relação entre a concentração do composto que permanece em solução e o sorvido no sólido diminui com o aumento da concentração do soluto, proporcionando uma curva côncava (**Figura 12**), sugerindo uma saturação progressiva do sólido. Neste caso, a curva não atinge um patamar definido, ou seja, o HA não mostra claramente uma capacidade de sorção limitada (Limousin et al., 2007).

Os resultados de sorção e dessorção obtidos foram modelados pela equação de Freundlich na forma logarítmica (Equação 15) e os parâmetros de sorção obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.





$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + \frac{1}{n} \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (\text{Eq. 15})$$

**Figura 12** - Isothermas de sorção modeladas pela equação de Freundlich, na forma logarítmica (A) e linear (B) para ENR, CIP e SQX nos HA do solo LVAd, LVe e RQo.

**Tabela 6** - Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich ( $K_F$  e  $1/n$ ), para os fármacos avaliados nos diferentes HA extraídos.

Freundlich, $K_F(\mu\text{g}^{1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1})$				
HA	Estudo	$K_F$ HA	$1/n$	r
Ciprofloxacin (CIP)				
HA-LVAd	S	15136	0,65	0,979
	D	11491	0,53	0,965
HA-RQo	S	8784	0,74	0,948
	D	15776	0,68	0,961
HA-LVe	S	9423	0,96	0,948
	D	15643	0,85	0,961
Enrofloxacin (ENR)				
HA-LVAd	S	11272	0,62	0,923
	D	15959	1,15	0,907
HA-RQo	S	6486	0,84	0,933
	D	17783	1,97	0,904
HA-LVe	S	6500	0,84	0,941
	D	13932	1,02	0,947
Sulfaquinoxalina (SQX)				
HA-LVAd	S	853	0,65	0,957
	D	811	0,50	0,917
HA-LVe	S	1001	0,42	0,994
	D	800	0,24	0,959
HA-RQo	S	1030	0,25	0,953
	D	683	0,13	0,960

S: sorção; D: dessorção.

O modelo de Freundlich foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento de sorção dos fármacos avaliados (**Figura 12 e Tabela 6**) em todos os HA extraídos ( $r > 0,99$ ). Todos os valores de  $1/n$  (exponente de Freundlich), que descreve a intensidade de sorção/dessorção derivados do modelo de Freundlich para o processo de sorção foram inferiores a 1, indicando a não-linearidade das

isotermas de sorção. Este comportamento também foi observado por diversos autores quando avaliadas as isotermas de sorção de substâncias químicas não polares e polares, como os hidrocarbonetos poliaromáticos (Liang et al., 2006b) e antimicrobianos, tais como, tetraciclinas (Pils e Laird, 2007) e norfloxacin (Zhang et al., 2012), sobre HA extraídos de solo.

Os valores de  $n$  refletem os sítios de distribuição de energia e, em geral, quanto menores estes valores, mais heterogêneos são considerados os sítios de sorção no sorvente (Limousin et al., 2007). A natureza heterogênea dos HA provavelmente torna mais difícil a sorção de moléculas adicionais de uma substância em altas concentrações. Isso pode ocorrer quando os locais de ligação específicos se tornam saturados e os locais restantes são muito mais fracos para sorver as moléculas. Em concentrações mais baixas, as moléculas interagem preferencialmente com sítios de sorção de maior afinidade (ou sítios de energia) e possuem maiores coeficientes de distribuição de sorção.

Do mesmo modo, foram evidenciados maiores coeficientes de sorção para a CIP quando comparado com a ENR, indicando que o nitrogênio do grupo piperazinil na molécula de FQ desempenha um papel chave no mecanismo de sorção.

O HA extraído do solo LVAd apresenta um maior  $K_F$  de sorção para as FQ quando comparada com os outros tipos de HA extraídos e avaliados. Para este material húmico também tinha sido evidenciado um maior valor de  $q_e$  (derivado da cinética de sorção). Portanto, as diferenças estruturais deste HA com referência aos outros HA avaliados é de importância no processo de sorção.

Em geral, os valores de  $K_F$  obtidos para as etapas de dessorção foram superiores àqueles observados para as etapas de sorção, demonstrando que a capacidade de dessorção das FQ nos sorventes é provavelmente um processo desfavorável.

Na **Tabela 6** é também apresentada o valor de  $K_F$  para a sorção da SQX nos HA, indicando uma baixa sorção da SQX quando comparada com as FQ. Além disso, o processo de sorção é reversível, uma vez que o  $K_F$  de dessorção é de magnitude igual ao de sorção. A SQX tem maior afinidade por HA com maior proporção de compostos alifáticos como o HA-RQo. Este HA apresentou maior razão H/C, evidenciado no espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR pela presença de sinais mais intensos na região de 45 a 0 ppm. Estes resultados indicam que a sorção de SQX

deve ocorrer via ligações de hidrogênio, mas também via forças de Van der Waals com as estruturas aromáticas dos HA (Kahle e Stamm, 2007a). Do ponto de vista ambiental, este fato é relevante uma vez que compostos de estruturas relacionadas com a SQX serão moléculas facilmente lixiviadas do solo para corpos aquáticos.

Na **Tabela 7** foram comparados os resultados dos experimentos de sorção de ENR nos solos RQ (N1) e LV(N2) oriundos da pesquisa de Vieira e Fostier (2016) com os coeficientes de sorção de Freundlich calculados das isotermas construídas com os HA extraídos destes mesmos solos. Estes HA foram escolhidos por serem dos solos que apresentaram os dois extremos em referência a capacidade de sorção exibida para ENR. Destaca-se dos resultados, o fato que a magnitude do parâmetro de  $K_F$  nos HA ser 10 vezes maior que a sorção no solo correspondente, o qual reflete a alta densidade de sítios de sorção disponíveis nos HA. Também, ao comparar os valores de  $K_F$  de sorção da ENR no solo, observa-se que o  $K_F$  de sorção no solo LV(N2) é duas vezes maior do que o  $K_F$  no solo RQ(N1). Entretanto, a sorção do mesmo fármaco nos HA extraídos destes mesmos solos apresentou um  $K_F$  de magnitude similar. Este fato pode refletir que nestes solos a diferença na capacidade de sorção é ditada pela carga de argila do solo (LV (N2) apresenta uma porcentagem de argila, de 56%, quando comparado com 6% do solo RQ) e não pela matéria orgânica do solo.

**Tabela 7** - Coeficientes de sorção de Freundlich para ENR nos solos e no HA extraídos destes solos.

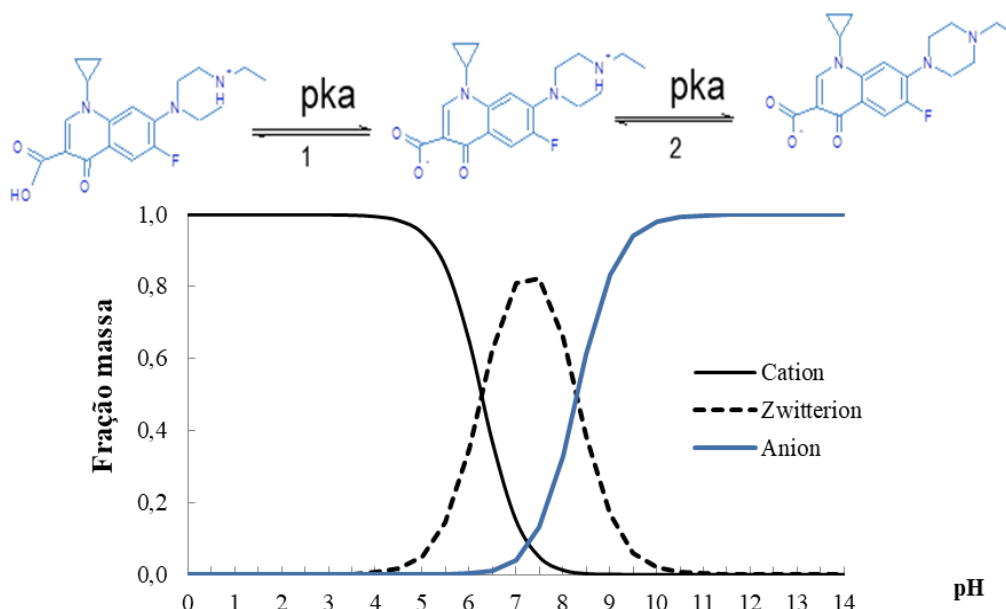
Freundlich, $K_F(\mu\text{g}^{1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1})$					
Solo	Estudo	$K_F$ Solo	$K_F$ HA	1/ n	R
Enrofloxacin (ENR)					
RQ(N1)	S	371	8395	0,83	0,937
	D	268	18239	1,06	0,947
LV(N2)	S	874	7870	0,95	0,952
	D	1350	16982	1,15	0,932
LVAd	S	343	11272	0,62	0,923
	D	1592	15959	1,15	0,907

S: sorção; D: dessorção.

#### IV.8. Efeito do meio de sorção no potencial de sorção e avaliação do mecanismo de sorção

O estudo anterior revelou altos valores de  $K_F$  para a ENR e CIP nos HA avaliados. Os valores de  $K_F$  se encontram em uma ampla faixa, de 6486 a 11272  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ , o que indica diferenças na composição química dos HA presentes em cada solo e, portanto, sítios de ligação específicos para a sorção das FQ.

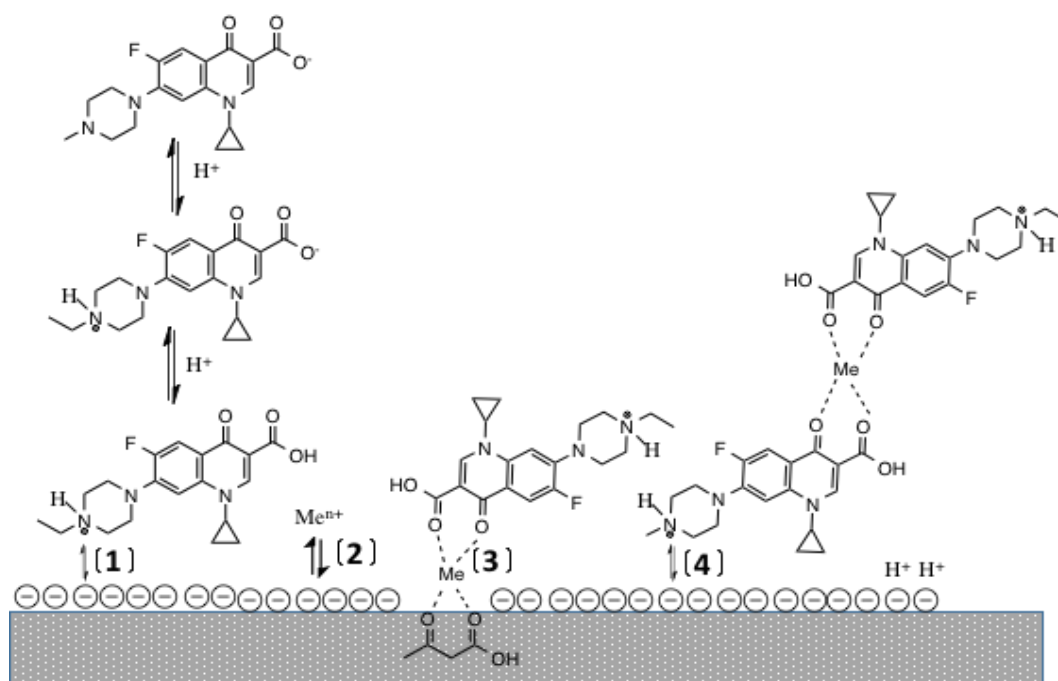
Além da composição química dos HA, a carga da FQ desempenha um papel importante no processo de sorção. Em solução, podem existir as formas catiônicas (ENR  $\text{H}_2^+$ ), zwitteriônicas (ENR  $\text{H}^\pm$ ) e aniônicas (ENR<sup>-</sup>), dependendo do pH da solução. A especiação de ENR em função do pH é mostrada na **Figura 13**.



**Figura 13** - Especiação da ENR em função do pH;  $\text{pK}_{a1}$  5,9 e  $\text{pK}_{a2}$  8,0.

Teoricamente, há pelo menos quatro possíveis mecanismos de interação para explicar a interação do antimicrobiano FQ com os HA (**Figura 14**):

- [1] Interação iônica das porções negativamente carregadas do HA com a forma catiônica de ENR (ENR  $\text{H}_2^+$ );
- [2] Interação iônica do cátion do eletrólito da solução e sítios de troca no HA;
- [3] Interação mediada por ligação de cátions, promovidas pelo íon divalente do eletrólito entre ENR e grupos funcionais do HA;



**Figura 14** - Possíveis vias e mecanismos de interação das FQ nos HA. Adaptado de Martinez-Mejia et al. (2017)

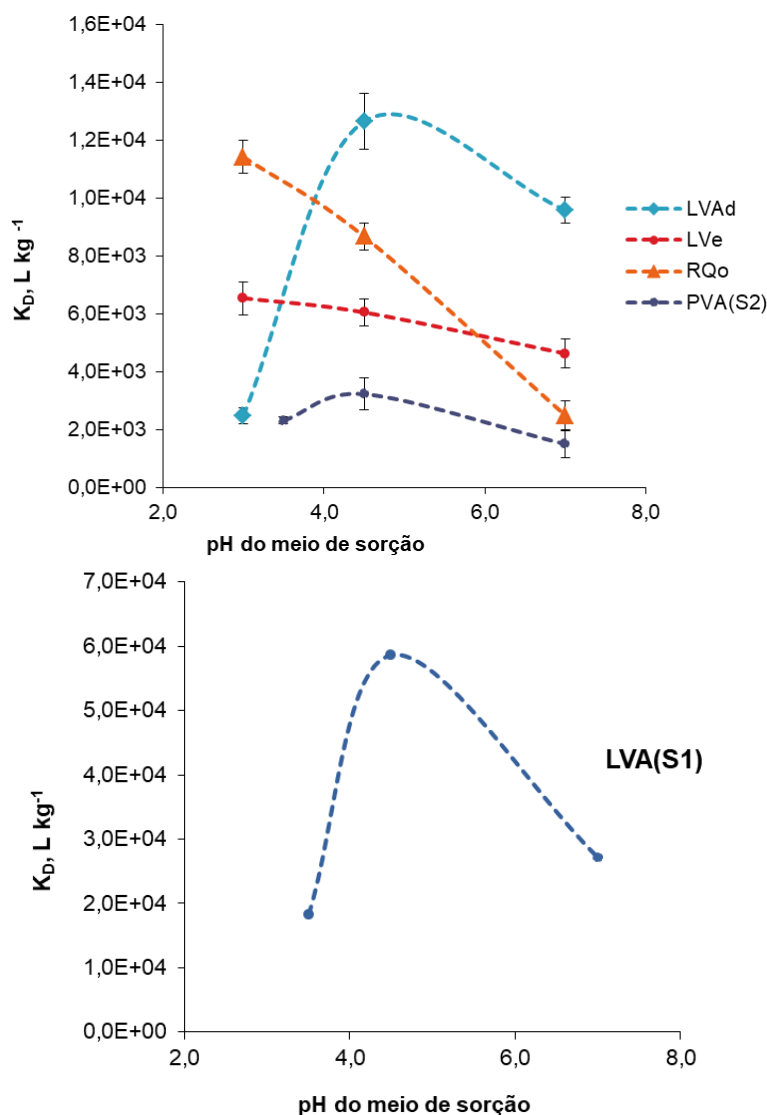
A fim de obter informações sobre o mecanismo predominante envolvido no processo de sorção das FQ, experimentos de sorção foram realizados com os HA previamente avaliados (LVAd, LVe, RQo), assim como, os HA extraídos dos solos LVA(S1) e PVA(S2). O interesse de incluir estes dois HA neste tipo de estudo foi resultante das características estruturais apontadas na análise elementar e NMR. A molécula modelo usada foi a ENR.

Foram realizados estudos mudando as condições do meio:

- (i) O pH da solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  usada como eletrólito foi ajustado a valores de 3,0, 4,5 e 7,0. O objetivo deste estudo foi verificar as possíveis interações dependentes da carga.
- (ii) A concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$  no pH natural de 4,5 foi variada a valores de 0,001, 0,01, 0,05 e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; este estudo permitira avaliar a possível competição exercida por cátions concomitantes no processo de sorção.
- (iii) Finalmente foi avaliado o impacto da concomitância no meio de sorção de diferentes íons metálicos divalentes e monovalentes:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ .

Neste caso os resultados foram comparados através dos coeficientes de distribuição de sorção ( $K_D$ ,  $\text{L kg}^{-1}$ ). Para a determinação deste parâmetro foi considerado somente a faixa linear da isoterma de sorção (entre  $0,5$  e  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A dependência do  $K_D$  em função do pH para os HA extraídos dos diferentes solos está apresentada na **Figura 15**. É possível concluir que a sorção depende não somente da espécie na qual se encontra a ENR, mas também da composição química dos HA.



**Figura 15** - Valores dos coeficientes de distribuição  $K_D$  ( $K_D, \text{L kg}^{-1}$ ) em função do pH para a sorção de ENR em HA extraídos dos solos. (As barras de erro representam as estimativas dos desvios padrão da análise em triplicata). As isotermas foram construídas usando solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito.

Os HA dos solos LVe, RQo e PVA(S2) apresentaram um comportamento semelhante em função do pH do meio, isto é, a sorção diminui com um aumento do pH da solução aquosa de cloreto de cálcio. Esta tendência pode ser explicada se for considerada como mecanismo predominante do processo de sorção a interação

eletrostática do fármaco protonado ( $\text{ENR H}_2^+$ ) com os sítios carregados negativamente dos HA (sítios na forma desprotonada). Vale lembrar que à valores de  $\text{pH} < 4,5$ , a forma catiônica da ENR é predominante (devido à protonação da amina do grupo piperazinil, **Figura 13**) e que a maiores valores de  $\text{pH}$  a forma zwitteriônica da  $\text{ENR}^\pm$  se encontra em maior proporção, diminuindo a possibilidade de interação mediante mecanismo de troca catiônica.

No caso dos HA dos solos LVAd e LVA(S1) uma diferente tendência foi observada. Para estes HA a sorção de ENR foi favorecida em  $\text{pH } 4,5$ , destacando a elevada magnitude do  $K_D$  para o solo LVA(S1).

Considerando que tanto no  $\text{pH } 4,5$  como no  $\text{pH } 3,0$  o fármaco (ENR) na sua forma protonada ( $\text{ENR H}_2^+$ ) é predominante, o evidente aumento nos valores de sorção a  $\text{pH}$  de  $4,5$  dos HA LVAd e LVA(S1) pode estar relacionado ao número de sítios de cargas negativas nestes HA. Com isso, é possível inferir que as moléculas nos HA dos solos LVAd e LVA(S1) são constituídas por grupos funcionais ácidos mais fracos do que os dos outros três HA dos solos LVe, RQo e PVA(S2).

No  $\text{pH } 7$  é de se esperar que os coeficientes de sorção sejam menores (como observado para o HA do solo RQo) do que no  $\text{pH } 4,5$ . Isso pode ser explicado pelo fato que, mesmo com um provável aumento no número de sítios disponíveis com carga negativa nos HA (grupos funcionais ácidos desprotonados), a molécula de ENR estará 85% na sua forma zwitteriônica e apenas 7% na sua forma catiônica, diminuindo a possibilidade de interação mediante o mecanismo de troca catiônica.

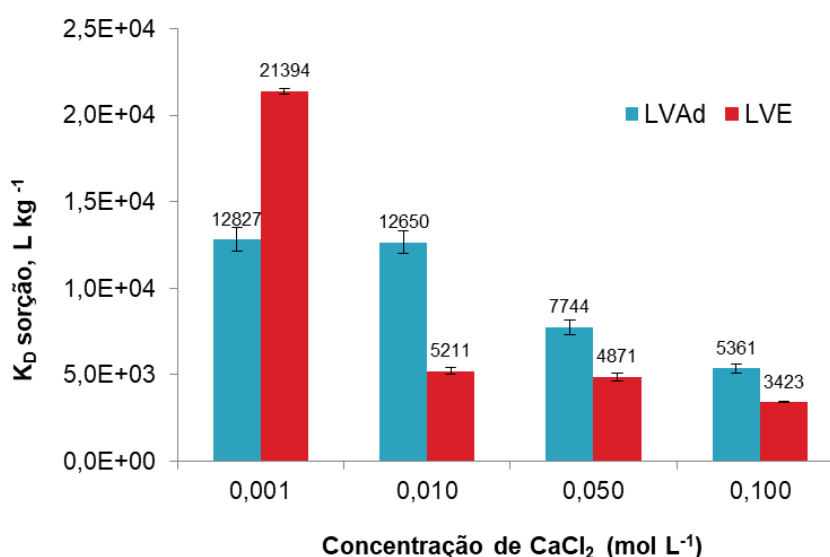
Entretanto, também pode ser observado que alguns dos HA avaliados (LVAd) mantém seu potencial de sorção mesmo com aumento do  $\text{pH}$ , indicando que neste caso o processo de sorção não é somente determinado por uma interação de troca e que interações adicionais são relevantes na sorção.

Avaliando as condições do meio e considerando a menor afinidade de participar em processos de troca da ENR zwitteriônica (em comparação com o cátion), é provável propor que os íons cálcio em solução podem intermediar a sorção da ENR mediante um mecanismo de sorção mediada por ligação de cátions. Esta interação é facilitada possivelmente pelo seu grande conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio fenólico característico destes HA, evidenciado nos sinais na região de 161-140 ppm dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR (**Tabela 3**, pág. 91) (Uivarosi, 2013).



É bem conhecido que as FQ formam complexos com alguns íons metálicos divalentes e trivalentes em solução. De acordo com Tan et al. (2015) a CIP pode formar um complexo fraco 1:1 com Ca (II) em condições neutras ou básicas. Devido à estrutura semelhante da CIP com a ENR também é esperado que em pH 7 a formação do quelato de ENR com Ca (II) seja favorável. No entanto, de acordo com Uivarosi (2013), os quelatos são mais solúveis em solução aquosa do que a ENR livre, o que consequentemente diminuiria o coeficiente de partição octanol-água e explicaria uma menor interação desses complexos com a matéria orgânica dos HA.

Para entender o papel do cátion divalente nos processos de sorção, foram realizados estudos utilizando cálcio em diferentes concentrações no pH natural (4,5) dos HA provenientes dos solos LVAd e LVe. No pH 4,5 a forma catiônica (ENR  $H_2^+$ ) é predominante em solução e os resultados de  $K_D$  calculados para diferentes concentrações de cloreto de cálcio são mostrados na **Figura 16**.



**Figura 16** - Valores dos coeficientes de distribuição  $K_D$  ( $L\ kg^{-1}$ ) em função da concentração de  $CaCl_2$  (As barras de erro representam os desvios das análises realizadas em triplicata). A isoterma foi construída sem ajuste do pH (pH natural do solo).

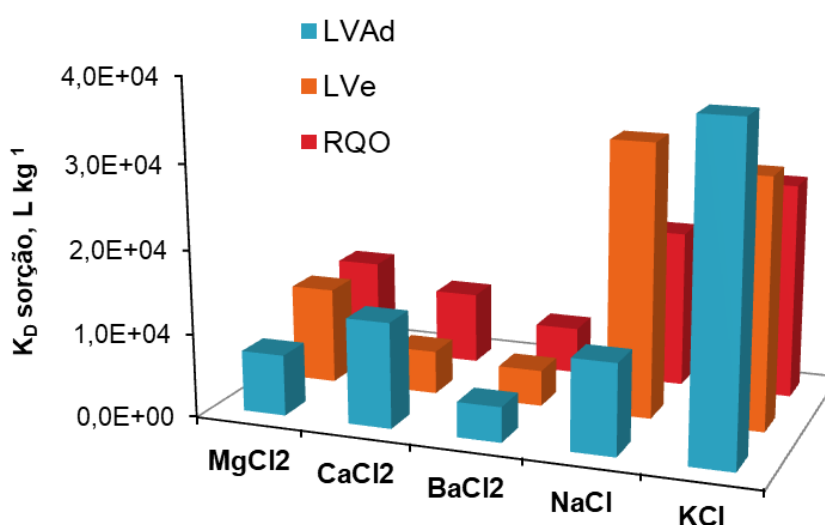
Foi observada uma diminuição rápida e significativa na quantidade de ENR sorvida nos HA extraídos do solo LVe quando foi alterada a concentração do cátion cálcio de 0,001 a 0,01 mol  $L^{-1}$  no pH natural do solo. A hipótese que poderia

explicar esse comportamento é que os íons cálcio divalentes podem competir ativamente por locais de troca catiônica (principalmente grupos carboxilas dissociados) nos HA e, portanto, causar um efeito supressor na sorção da ENR.

No entanto, a extensão desta competição parece ser dependente das propriedades físico-químicas dos HA. Ainda, foi observado que nestas mesmas concentrações de cátion o HA do solo LVAd parece não apresentar mudanças significativas no seu potencial de sorção. Isto indica que mesmo com uma quantidade maior de Ca(II) sorvida na superfície do HA LVAd existe uma segunda via de sorção de ENR, provavelmente através da formação de um complexo ternário entre a ENR e os grupos funcionais de cálcio e HA ( $\text{ENR}^{\pm}\text{-Ca}^{+2}\text{-HA}$ ).

Já em concentrações de íon cálcio superiores a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  outra tendência é observada. A sorção da ENR no HA do solo LVe permanece constante em contraste com o comportamento no HA-LVAd, onde a sorção continua diminuindo com o aumento da concentração de cloreto de cálcio. Estes resultados indicam que um maior número de sítios para ligar o íon cálcio estão disponíveis no HA-LVe, ou que estas interações eletrostáticas parecem estar estabilizadas, tanto pelas quantidades de grupos doadores de próton presentes nas estruturas deste HA, como pela aromaticidade do HA-LVe, permitindo manter seu potencial de sorção.

Um estudo adicional foi realizado, utilizando diferentes eletrólitos em substituição ao cloreto de cálcio. Relata-se que os quelatos de magnésio com as FQ são mais estáveis do que os respectivos quelatos de cálcio e que a interação é aumentada com o aumento do pH (Tan et al., 2015). Para investigar em que extensão o cátion do eletrólito contribui para a sorção, experimentos de sorção foram realizados usando diferentes eletrólitos:  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ , KCl e NaCl. As concentrações dos eletrólitos foram mantidas em  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e os resultados são mostrados na **Figura 17**.



**Figura 17-** Valores dos coeficientes de distribuição  $K_D$  ( $L\ kg^{-1}$ ) em função do eletrólito no estudo de sorção da ENR nos HA extraídos dos solos LVAd, LVe e RQo.

É possível verificar uma dependência do  $K_D$  com a natureza do cátion em solução e com a composição dos HA. Uma maior sorção de ENR foi verificada no HA do solo LVe e RQo quando Mg(II) foi usado em vez de Ca(II). Sendo que comportamento oposto foi observado para os HA-LVAd. Em trabalho reportado na literatura Kalinichev e Kirkpatrick (2007) usando modelagem computacional foi reportado que o íon Mg(II) interage pouco com a SOM devido à sua forte camada de hidratação comparado com íons Ca(II) que tem uma associação mais forte e forma complexos de esfera interna com os grupos carboxilato da SOM. Os autores observaram que a ligação cátion-SOM ocorre principalmente com os grupos carboxilato e, em menor grau, com grupos fenólicos e outros grupos -R-OH (Christl, 2012).

Em relação aos cátions monovalentes ( $Na^+$  e  $K^+$ ) em solução, a sorção de ENR foi significativamente maior do que nas soluções contendo cátions divalentes. Esta observação é relevante do ponto de vista ambiental, pois é possível prever que solos ricos em potássio serão solos passíveis de acumular este tipo de contaminante.

Os resultados demonstram novamente que os cátions divalentes podem de fato competir com a porção carregada positivamente do antimicrobiano ENR para interações eletrostáticas com a fração negativa de HA, diminuindo assim a sua

sorção. No entanto, a extensão desta competição parece depender do tipo de HA e do cátion envolvido.

Tendo sido propostas as possíveis vias para explicar a interação do antimicrobiano com os HA, à questão que surge é a de quais são os grupos funcionais orgânicos dos HA que são responsáveis pelas diferenças no comportamento de sorção.

#### **IV.8.1. Possíveis mecanismos de sorção da ENR nos HA**

Levando em consideração a caracterização elementar e a análise dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR dos HA (**Tabela 2 e Tabela 3**), e os resultados anteriormente expostos é possível inferir que a interação governada pela troca catiônica é predominante nos HA do solo RQo que contêm compostos orgânicos com abundantes grupos funcionais identificados como carboxilas (210-161 ppm, pag 91) e com relativamente alta proporção de compostos doadores de ligação H com estruturas semelhantes de estruturas de hidratos de carbono. Uma vez que, as porções doadoras da ligação de hidrogênio destes HA diminuem à medida que o pH aumenta, o potencial de sorção neste tipo de HA diminui rapidamente à medida que o pH aumenta.

A interação de sorção direcionada para a formação de pontes catiônicas e/ou complexação superficial nos HA dos solos LVAd e LVA(S1) é facilitada pelos grupos ligados conjugados, contendo grande teor de grupos funcionais com oxigênio, OH fenólico ou estruturas como ligninas, que apresentam sinais na região de 161 - 140 ppm no espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR (**Tabela 3**). A maior razão O/C do solo LVAd provem de sua maior proporção de grupos fenólicos e de estruturas que se assemelham a taninos e ligninas, assim como o teor de estruturas de carboidratos.

Estes resultados estão de acordo com simulações moleculares reportadas por Aristilde e Sposito (2010), nos quais os autores propõe que as FQ se ligam a cátions divalentes permitindo a interação mediada por ligação de cátions aos HA, e que essas interações podem ser promovidas por grupos C-OH fenólico presentes nos HA.

Além disso, pode-se inferir a partir destes resultados que, apesar dos HA-LVe não terem abundantes grupos funcionais identificados como carboxilas, a maior aromaticidade na estrutura HA pode desempenhar um papel na interação

estabilizante ENR-HA (interação  $\pi$ - $\pi$  entre o anel benzeno da ENR e as porções aromáticas destes HA) favorecendo os processos de troca catiônica (Aristilde e Sposito, 2010).

Apesar do grupo carboxila dos HA ter sido relatado como o sítio preferencial para a interação de sorção de compostos iônicos (Leal et al., 2013), a partir dos resultados obtidos neste trabalho se observa que dentre o conjunto de HA avaliados o maior valor de  $K_D$  corresponde ao HA com menor porcentagem relativa de grupos funcionais ácido carboxila na sua estrutura, mas que possui um alto caráter aromático assim como a presença de grupos funcionais o-alquila.

#### **IV.9. Coeficientes de sorção $K_D$ : estudo comparativo**

Com o conjunto de HA avaliados algumas tendências foram evidenciadas e o comportamento ambiental dos antimicrobianos pode ser correlacionado com a composição dos HA.

Entretanto, buscando uma melhor compreensão do mecanismo de sorção dos antimicrobianos em HA, foram incluídos HA extraídos de outros tipos de solos e diferentes do que os listados anteriormente. Estas amostras de HA previamente isolados de solos e purificados foram cedidas pelo Dr. Ademir Fontana, pesquisador da EMBRAPA do Rio de Janeiro. Este conjunto de amostras incluiu HA extraídos de Organossolos, Cambissolos, Espodossolos e Gleissolos e uma amostra de HA extraído de sedimento. Estes HA foram empregados em outros trabalhos já publicados (Fontana et al., 2008a; Fontana et al., 2008b; Santos et al., 2013).

As características dos solos dos quais foram extraídos os HA foram informadas pelo Dr. Ademir Fontana e são apresentados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Propriedades físico-químicas dos solos dos quais os ácidos húmicos foram extraídos.

Solo	Horizonte	Profundidade cm	COT, mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	SB, mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>	H, mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>	CTC, mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	Al, mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>	V, %
<b>OX (MS2)</b>	<b>Organossolo haplico (H hístico)</b>	0-40	18,2	3,51	22,8	27,93	1,6	13
<b>OX (SC1)</b>	<b>Organossolo haplico (H hístico)</b>	0 -17	27,7	17	19,1	36,44	0,3	47
<b>OXs (SP1)</b>	<b>Organossolo haplico Sáprico</b>	0-12	23,1	3,15	57,8	61,4	0,5	5
<b>O (RJ2)</b>	<b>Organossolos O hístico</b>	0-42	17,04	1,92	33,0	34,92	0,0	5
<b>CH (MB4)</b>	<b>Cambissolo A húmico</b>	-	2,5	0,55	12,1	14,25	1,6	4
<b>EK (RS1)</b>	<b>Espodossolo humiluvico</b>	0-47	5,6	1,00	21,0	31,0	9,0	3
<b>EK (RO)</b>	<b>Espodssolo humiluvico</b>	28-42	1,1	0,44	3,8	4,24	0,0	10
<b>SPB</b>	<b>Sedimento marinho</b>	103-135	1,7	0,5	6,2	15,8	9,1	3
<b>GM (PM)</b>	<b>Gleissolo melânico</b>	0-13	6,2	12,04	10,9	22,94	0,0	52

COT: Carbono orgânico total; SB: soma de bases; H: hidrogênio; CTC: capacidade de troca de cátions; Al: alumínio, V: saturação por bases.

Para avaliar a capacidade de sorção destes novos HA, as condições de razão HA:solução, tempo de equilíbrio aparente e demais condições de análises foram adotadas dos estudos anteriores.

No entanto, a obtenção de dados foi simplificada e a comparação da capacidade de sorção destes HA foi avaliada calculando o coeficiente de partição  $K_D$  ou coeficiente de distribuição.

A comparação da capacidade de sorção foi avaliada em base no  $K_D$  medido em condições experimentais (**Tabela 9**) para três diferentes antimicrobianos: ENR, CIP e SQX.

**Tabela 9** - Valores obtidos para coeficiente de distribuição ( $K_D$ ) para os fármacos avaliados em os diferentes HA.

HA	$K_D, L\ kg^{-1}$		
	ENR	CIP	SQX
HA-EK(RS1)	1500	1940	36
HA-EK(RO)	5621	2452	25
HA-OXs(SP1)	4347	3847	634
HA-OX(MS2)	7396	2204	86
HA-PVA(S2)	5939	12645	537
HA-CH(MB4)	8820	4173	325
HA-LVe	9231	10351	994
HA-RQ(N1)	11133	-	-
HA-LV(N2)	11370	29695	1109
HA-RQo	11783	11886	520
HA-OX(SC1)	12491	8745	1077
HA-GM(PM)	13141	7229	903
HA-LVAd	16041	21663	1046
HA-O(RJ2)	19973	14440	686
HA-SPB	21306	19462	1653
HA-LVA(S1)	27143	73759	581

A avaliação do potencial de sorção na coleção de amostras para as FQ revelou valores de coeficientes de sorção ( $K_D$ ) na faixa de 1500 a 27000 L kg<sup>-1</sup>. Com base nos valores calculados, a priori os HA estudados podem ser distinguidos em três grupos:

- HA com valores de  $K_D < 10000$  L kg<sup>-1</sup> que incluem os HA extraídos de Latossolos LVe e de Espodssolos EK(RS1), EK (RO) e PVA(S2), assim como os HA do Organossolo histico OX(MS2);
- HA com valores  $10000 \text{ kg L}^{-1} < K_D < 20000$  L kg<sup>-1</sup> para os HA LVAd, RQo, RQ(N1), LV(N2), OX(SC1) e o HA extraído de sedimentos marinhos GM(PM)
- Os HA O(RJ2), SP e LVA(S1) com valores de  $K_D > 20000$  L kg<sup>-1</sup>.

Em geral, os HA que apresentaram maior sorção para as FQ correspondem a solos com altos valores de CTC.

A alta dispersão nos valores permitiu confirmar os pressupostos anteriores, de que os HA dos solos brasileiros têm uma ampla diversidade estrutural que irá influenciar a mobilidade das FQ no ambiente.

O valor de  $K_D$  para a sorção da SQX nos HA é bem menor que os valores para as FQ. No entanto, se observa que neste conjunto de HA existem diferenças estruturais que fazem com que a SQX não apresente afinidade pelos HA dos solos EK (RS1 e RO), e apresente uma afinidade moderada pelos HA-SPB (este HA provem de um sedimento marinho).

#### **IV.10. Caracterização molecular dos HA extraídos**

Para avaliar a heterogeneidade estrutural dos HA e o impacto na capacidade de sorção de contaminantes no solo, se faz necessário caracterizar os grupos funcionais orgânicos presentes na fração da matéria orgânica a fim de se obter o reconhecimento das relações entre o comportamento destes contaminantes e as variações nos grupos funcionais orgânicos.

Para tanto, foram realizados os estudos de caracterização dos ácidos húmicos utilizando as técnicas de espectroscopia no IV e espectrometria de massas.

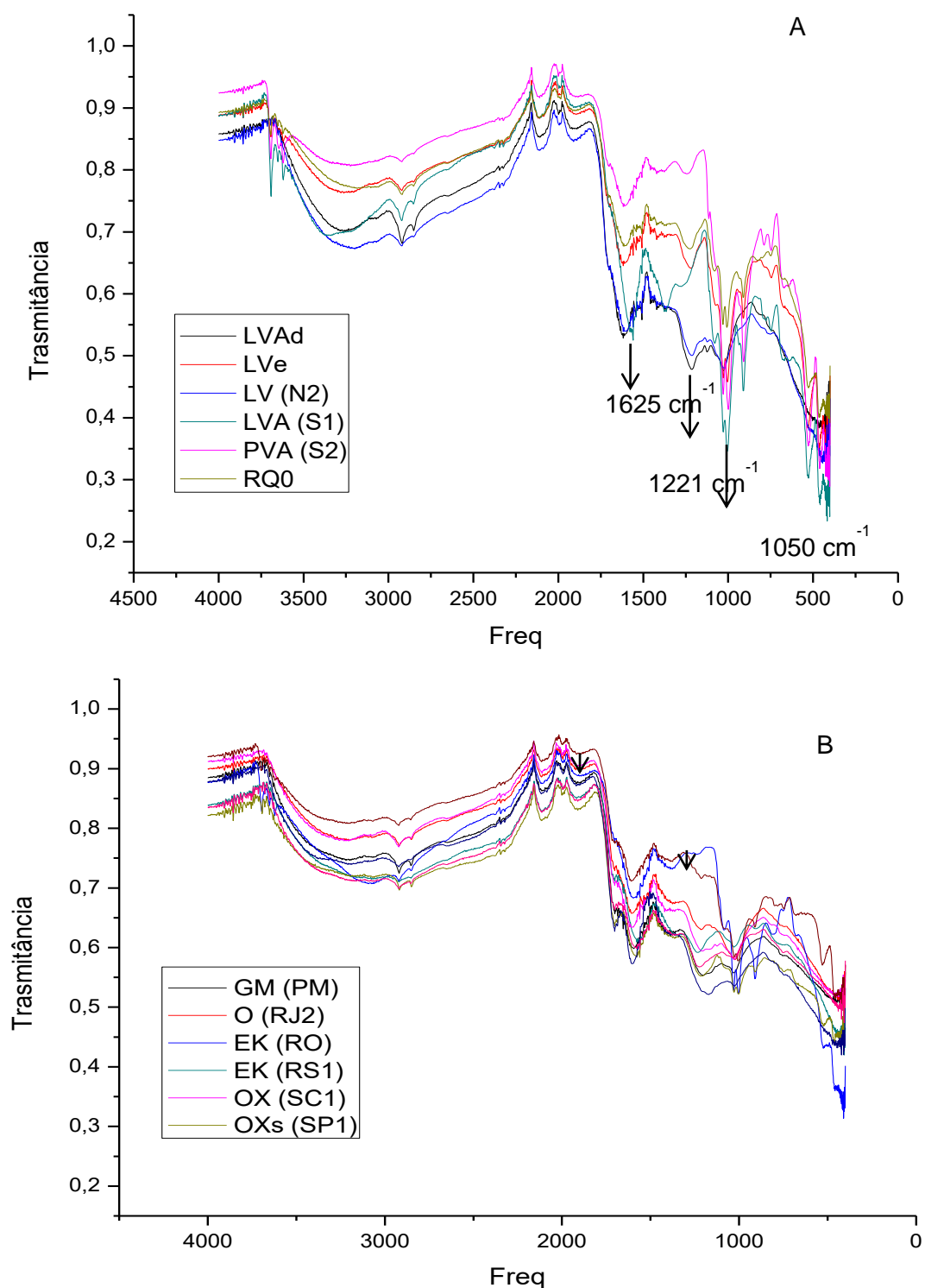


#### IV.10.1. Análise por espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia ATR-FTIR tem sido amplamente empregada para a caracterização de substâncias húmicas (HS) devido ao fato que as amostras podem ser avaliadas no estado sólido e por ser uma técnica rápida e simples.

Na **Figura 18** são apresentados os espectros de ATR-FTIR de alguns dos HA isolados dos solos coletados (foram feitas duplicata de extração e análise). Os espectros apresentaram um perfil típico de ácidos orgânicos fracos e polipróticos.

De modo geral, os espectros dos HA apresentam nove bandas de absorção bem definidas e comum a todos, e em todos os espectros aparece uma absorção centrada em  $1050\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída à presença de carboidratos nos HA. As absorções entre  $900$  e  $500\text{ cm}^{-1}$  são pouco relevantes, geralmente, atribuídas à presença de impurezas minerais nas HS.



**Figura 18** - Espectros de ATR-FTIR dos HA isolados dos solos. A: solos LVAd, LVe, LV(N2), LVA (S1), PVA e RQo e B: solos GM(PM), O(RJ2), EK(RO), OX(SC!) e OXs(SP1).

Algumas diferenças estruturais foram facilmente observadas entre os HA dos solos LVA(S1), PVA(S2) e LV(N2) (**Figura 18 A**). No HA-LVA(S1) se destacam

a presença de fortes bandas de absorção em torno de  $1625\text{ cm}^{-1}$  que sugere a presença de ligações do tipo C=C de anéis aromáticos, assim como a banda em  $1372\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação da ligação O-H em grupos fenólicos (estes resultados estão em concordância com os dados de  $^{13}\text{C}$  NMR). Já o espectro do HA-LV(N2), apresenta uma banda em torno de  $1221\text{ cm}^{-1}$  característica de grupos carboxílicos (Clark et al., 2010; Salloum et al., 2002).

A partir dos espectros de infravermelho foram calculados os seguintes índices:

- IA (aromaticidade):  $\text{C}=\text{C}/\text{C}-\text{H} = 1620 - 1600\text{ cm}^{-1} / 2940 - 2900\text{ cm}^{-1}$ ;
- IR1 (reatividade):  $\text{NH}_2/\text{COOH} = 1660 - 1630\text{ cm}^{-1} / 1720 - 1700\text{ cm}^{-1}$ ;
- IR2 (reatividade):  $\text{NH}_2/\text{COOH} = 1545 - 1505\text{ cm}^{-1} / 1720 - 1700\text{ cm}^{-1}$ ;
- IAM1 (amida I):  $\text{NH}_2/\text{C}-\text{H} = 1660 - 1630\text{ cm}^{-1} / 2940 - 2900\text{ cm}^{-1}$ ;
- IAM2 (amida II):  $\text{NH}_2/\text{C}-\text{H} = 1545 - 1505\text{ cm}^{-1} / 2940 - 2900\text{ cm}^{-1}$ .

Estes índices foram calculados como descrito no trabalho de Dias et al. (2009); Dick et al. (2003); Tivet et al. (2013) e apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10** - Índices de aromaticidade, reatividade, amida e policondensação dos HA, calculados a partir dos espectros ATR-FTIR.

Amostra	IA	IR1	IR2	IAM1	IAM2	Policondensação
LV (N2)	0,84	0,47	0,35	1,15	1,54	0,709
PVA (S2)	0,71	0,44	0,36	1,00	1,22	0,539
LVA <sub>d</sub>	0,86	0,45	0,35	1,24	1,58	0,698
LVE	0,85	0,41	0,32	1,22	1,56	0,606
RQ <sub>o</sub>	0,74	0,38	0,31	1,16	1,40	0,724
LVA (S1)	0,79	0,39	0,24	0,96	1,54	0,481
EK (RO)	0,53	0,39	0,28	0,68	0,96	0,742
CH (MB4)	0,73	0,59	0,38	0,93	1,46	0,834

Na literatura é reportado e é consenso que no processo de humificação ocorre à transformação de compostos com morfologia conhecida e identificável (como por exemplo, carboidratos, proteínas e ligninas) em compostos húmicos amorfos (substâncias húmicas) de maior estabilidade (Salloum et al., 2002). Com os resultados da **Tabela 10**, pode ser feita uma avaliação do grau de humificação

baseado na presença e/ou ausência de compostos como amidas (1660 - 1630 e 1545 - 1505  $\text{cm}^{-1}$ ), polissacarídeos (1080 - 1040  $\text{cm}^{-1}$ ) e compostos aromáticos (1620 - 1600  $\text{cm}^{-1}$ ). Assim, é possível identificar que os HA dos solos PVA(S2), LV(N2) e LVe são mais humificados do que os demais. Estes resultados estão em conformidade com as conclusões obtidas nas análises dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR.

Analisando os espectros ATR-FTIR em conjunto e mesmo fazendo cálculo destes indicadores, não foi possível observar padrões distintivos dos HA, apontando uma limitação desta técnica para detectar diferenças entre os HA dos diferentes solos. Embora existam diferenças entre os espectros obtidos de diferentes tipos de solo, a análise qualitativa dos espectros de cada substância húmica é bastante similar, ou seja, ocorrem pequenas alterações nos espectros como, por exemplo, pequenas variações nas intensidades das bandas de absorção e pequenos deslocamentos na frequência de absorção.

#### **IV.10.2. Análise multivariada dos espectros ATR-FTIR**

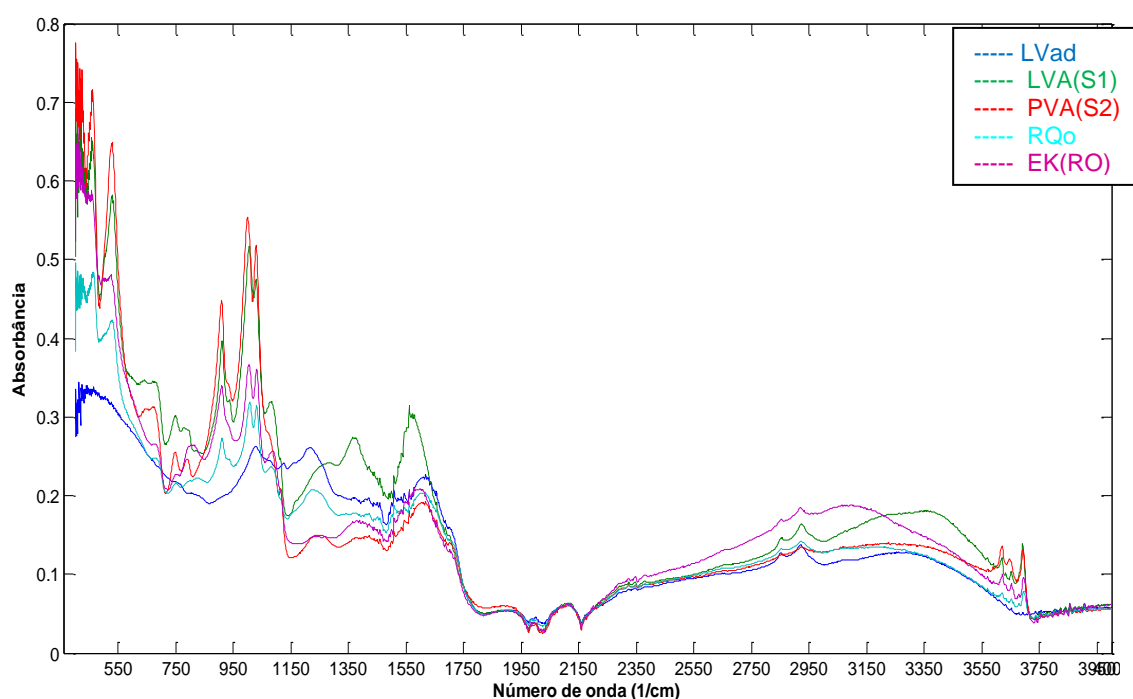
Os espectros ATR-FTIR dos HA são como uma impressão digital da amostra quando utilizado integralmente. Com a finalidade de identificar as características estruturais intrínsecas do material húmico extraído e aproveitar as informações das análises ATR-FTIR, foi construída uma matriz de dados e foi realizada a análise quimiométrica dos espectros.

Na análise foram incluídos os espectros FTIR da coleção de 18 amostras de HA e os espectros FTIR dos HA após terem sido fortificados (amostras de HA provenientes dos estudos de sorção). Ressalta-se que os valores de transmitância foram transformados em medidas de absorbância.

Para a análise multivariada foi realizado inicialmente um pré-tratamento dos dados dos espectros ATR-FTIR. O pré-tratamento é de especial importância, uma vez que os espectros ATR-FTIR são complexos. Assim, os valores gerados pelo pré-tratamento levam a melhorias significativas no desenvolvimento do modelo multivariado. Entretanto, a escolha do pré-tratamento tem de garantir que não se elimina informação química e física relevante para o sistema em estudo.

A primeira etapa do pré-tratamento consistiu na centralização dos dados na média, ou seja, na simples subtração da absorbância em cada comprimento de onda pela absorbância média neste mesmo comprimento de onda para o conjunto

das amostras. A centralização tem como objetivo prevenir que os pontos mais distantes do centro dos dados tenham maior influência do que os mais próximos, dando importância não à intensidade verificada, mas sim à sua distância do valor médio. Também foi incluído o método de correção multiplicativa de sinal (*Multiplicative Scatter Correction- MSC*) que corrige o efeito da dispersão da luz, causada pela falta de homogeneidade das amostras. O método de variação de Padrão Normal (*Standard Normal Variation Method, SNV*) foi avaliado, mas os resultados foram semelhantes ao método MSC. Os resultados do pré-tratamento podem ser visualizados na **Figura 19**.



**Figura 19** - Espectros de ATR-FTIR dos HA (na ordem) LVAd, LVA(S1), PVA(S2), RQo e EK(RO) após pré-tratamento(método de correção multiplicativa de sinal).

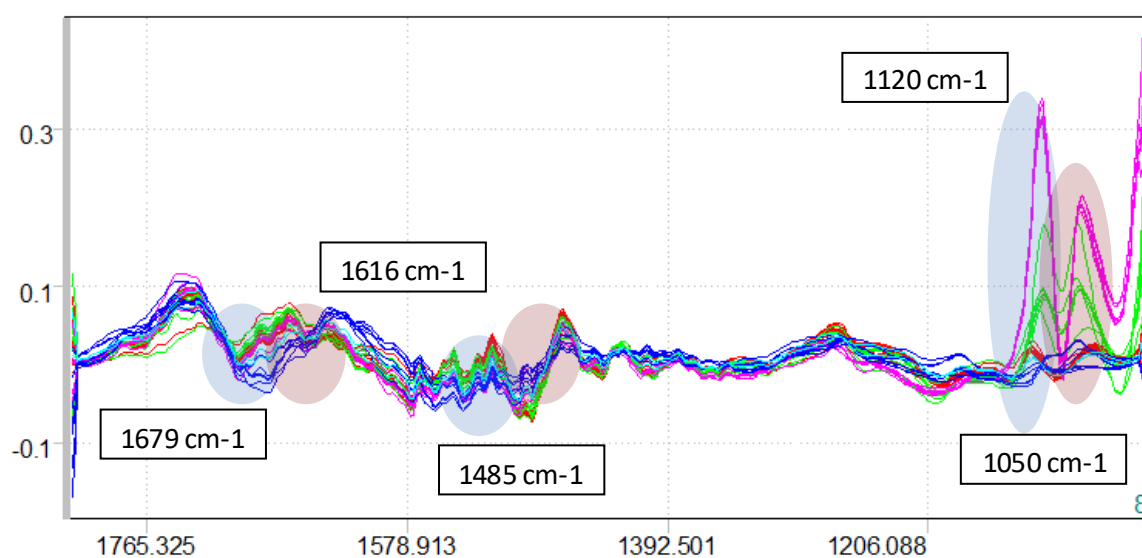
Após aplicar o pré-tratamento de MSC foram evidenciadas algumas diferenças nas intensidades dos sinais, principalmente na faixa de 1500 a 950 cm<sup>-1</sup>. Na **Figura 19** é possível observar uma diferença significativa entre os cinco espectros apresentados (na ordem LVAd, LVA(S1), PVA(S2), RQo e EK(RO)) principalmente nas frequências correspondentes aos estiramentos C=C de anéis aromáticos e a deformação de O-H em grupos fenólicos.

Destacam-se dos resultados, os espectro dos HA dos solos LVA (S1-Latossolo) e EK(RO-espodssolo). Estes HA apresentam sinais correspondentes a

compostos de caráter alifático (sinais em 2848 e 2917  $\text{cm}^{-1}$ ). No entanto, o HA-LVA(S1) também se caracteriza por apresentar sinal intenso entre 1620 e 1350  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo um alto conteúdo de aminas (proveniente de ligninas). Cabe ressaltar que o HA-PVA (S1) possui uma maior afinidade de sorção frente as FQ ( $K_D > 20000$ ) quando comparado com o HA EK(RO) ( $K_D < 5000$ ). Muito provavelmente esta diferença de afinidade de sorção por FQ esteja correlacionada com o conteúdo de grupos aminas neste HA.

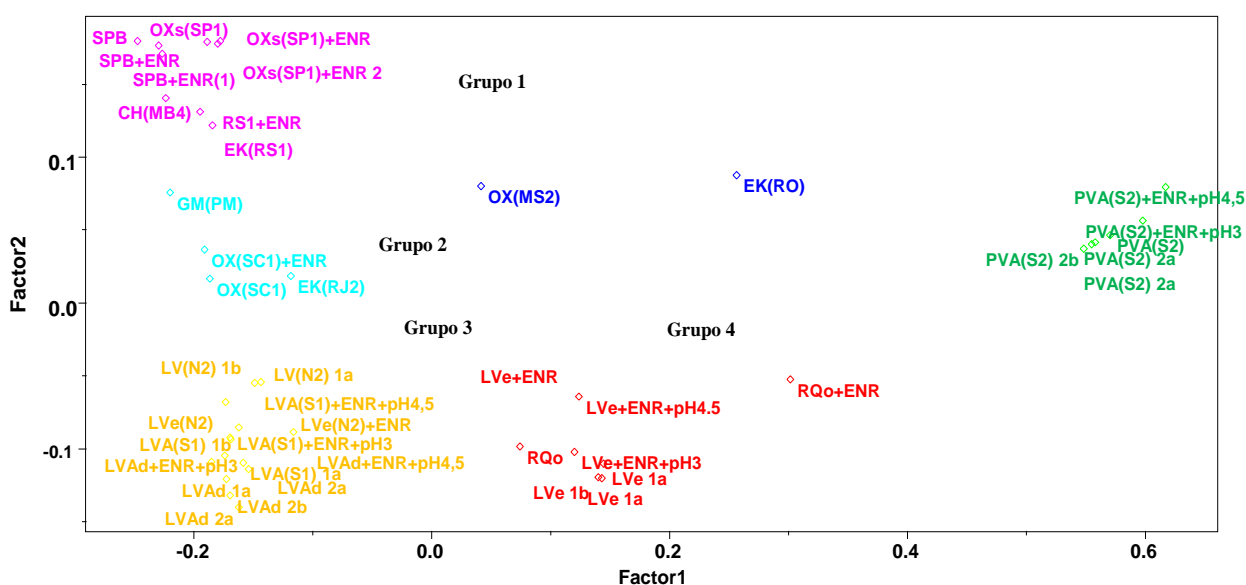
Grupos fenólicos e éster arílicos representados por vibrações em 1214  $\text{cm}^{-1}$  são especialmente abundantes na amostra LVAd.

Baseados nestas observações foram considerados que as vibrações de interesse ocorreram na janela espectral de 1819 a 1069  $\text{cm}^{-1}$  e, por isso, essa faixa dos espectros dos HA foi utilizada na análise por componentes principais (PCA). Finalmente, foram aplicados os métodos de derivada de primeira ordem (**Figura 20**).



**Figura 20** - Espectros de ATR-FTIR do total de HA avaliados, após pré-tratamento: centralização na média, o MSC e primeira derivada. Destacam-se em cor azul e rosa as frequências que identificam cada um dos grupos do PCA.

A análise multivariada permitiu reduzir o número de variáveis possibilitando o agrupamento de amostras com características similares através de uma representação em dimensões. A **Figura 21** representa o gráfico de *score* da PCA, o qual mostra que a variabilidade nas amostras pode ser reduzida a duas componentes principais. As componentes PC1 e PC2 explicam mais do 83% da variabilidade dos dados, enquanto a PC1 é capaz de explicar 72% da variância dos espectros ATR-FTIR (**Figura 21**).

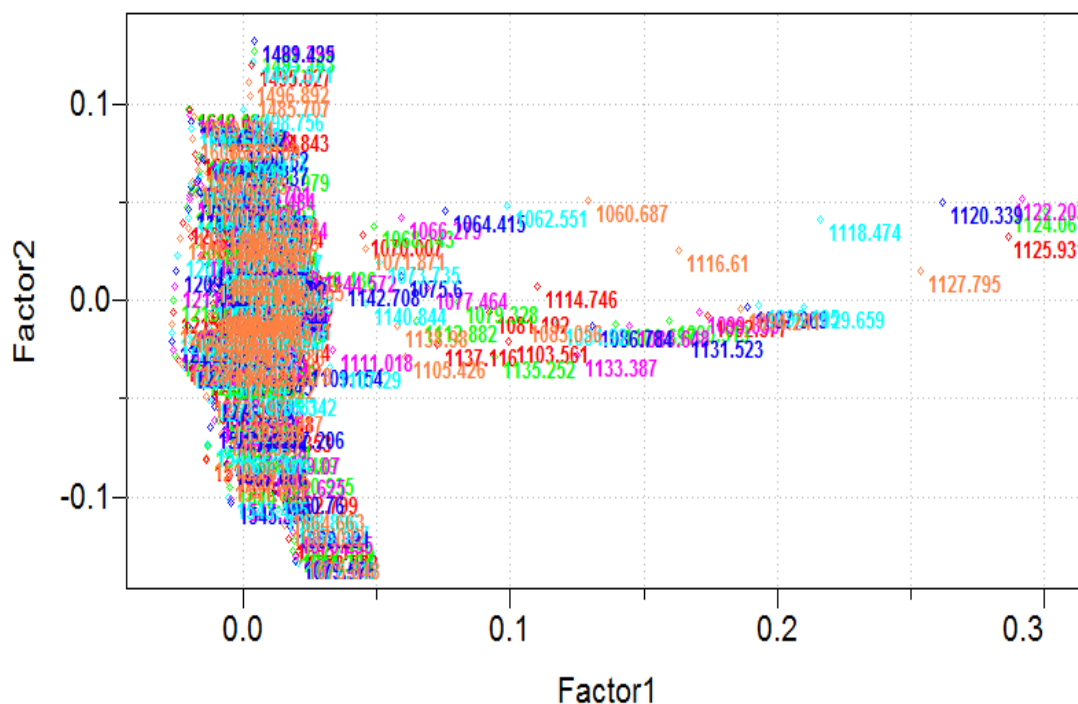


**Figura 21-** Gráfico de *scores* da análise de PCA dos espectros ATR-FTIR dos HA extraídos de diferentes solos e sedimentos.

Na análise de PCA as amostras são agrupadas com base na similaridade entre as mesmas (amostras semelhantes estão mais próximas entre si no espaço amostral). Assim, neste estudo são visíveis quatro grupos distintos e as amostras PVA(S2), EK(RO) e OX(MS2) podem ser considerado como *outliers*.

Pode ser observado, também, que a análise quimiométrica não revelou diferenças significativas nos espectros FTIR-ATR das amostras de HA antes e após de serem fortificadas com ENR (após os experimentos de sorção HA). Para as medidas o sólido proveniente dos estudos de sorção foi liofilizado antes análise por FTIR-ATR.

O gráfico de *loadings* é apresentado na **Figura 22** e indicam quais são os grupos funcionais que desempenham um papel importante na diferenciação estrutural dos HA dos solos avaliados.

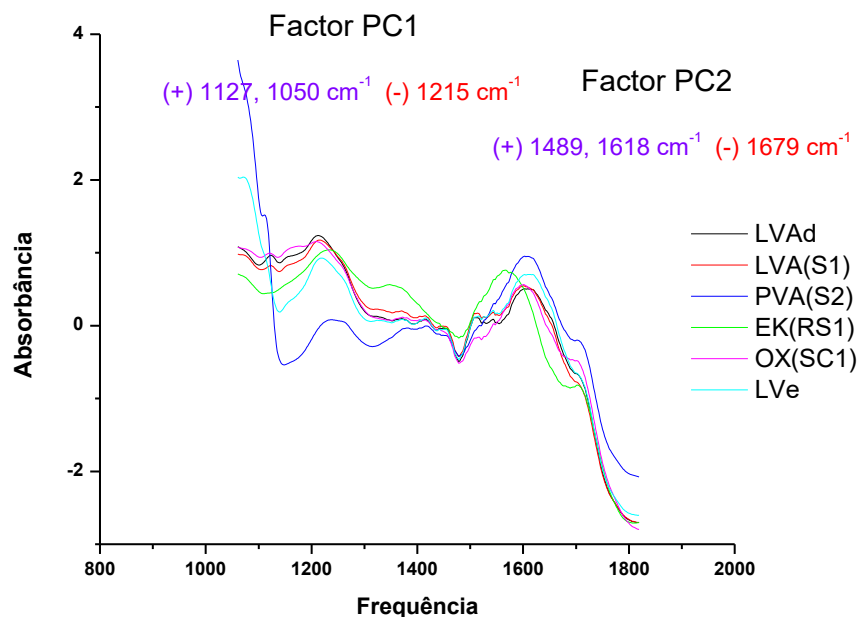


**Figura 22** -Gráfico de *loadings* (PC1 e PC2) da análise de PCA dos espectros ATR-FTIR dos HA extraídos dos solos.

As amostras de HA LVAd e LVA (S1), como proposto anteriormente, seguem um comportamento tal que sua interação com as FQ pode estar mediada por mecanismos de ponte catiônica. A PCA dos espectros identificou similaridades estruturais entre estas amostras permitindo agrupá-las (**Grupo 3**), sendo que este agrupamento está descrito pela componente 1. A frequência responsável pela separação é o sinal em (-)  $1214\text{ cm}^{-1}$ , que é específico de estiramento C-O em grupos carboxílicos e fenólicos aromáticos. E esta característica, também é compartilhada pelas amostras do **Grupo 2**. Nestes dois grupos se situam as amostras com valores de  $K_D$  de sorção maiores de 10000 para FQ. Assim mesmo de acordo com a PCA grupos funcionais carboxílicos e fenólicos encontram-se em menor proporção no HA-PVA(S2) e HA-EK(RO) (Benites et al., 1999; Cunha et al., 2009; Yan et al., 2013).

A característica responsável pela separação do HA PV (S2) é a banda em (+)  $1120\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao estiramento C-O em compostos de estrutura relacionada com polissacarídeos, álcoois alifáticos ou éteres. Além disso, a **Figura 23** mostra que estas frequências são de baixa intensidade nos espectros das amostras dos **Grupos 1, 2 e 3**.





**Figura 23** - Espectros de ATR-FTIR das amostras diferenciadas pelo PC1 (PVA(S2), LVe e LVAAd), assim como aquelas que foram separadas pela PC2 (OXs(SP1), OX(SC1) e EK(RS1)). No gráfico são indicadas as frequências responsáveis pela separação dos grupos no PCA.

A PC2 explica uma percentagem de 11% da variância. Os sinais de maior peso nesta componente (PC2 (+)) são os sinais correspondentes à deformação N-H e estiramento do C=N de aminas heterocíclicas ou estiramento de C=C aromático ( $1489 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) e o sinal em  $1600 \text{ cm}^{-1}$  que pode sugerir a presença de ânions carboxilatos (deformação axial assimétrica). Os sinais em  $1690 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento C=O em ácidos carboxílicos de cetonas alifáticas, aldeídos e ésteres (Ellerbrock e Gerke, 2013), foram responsáveis pela separação do **Grupo 3** (Salloum et al., 2002; Stenberg et al., 2010).

Estes resultados permitiram realizar algumas inferências e correlações com o mecanismo de sorção: HA oriundos dos solos LVAAd, LVA(S1) e LV(N2), assim como os HA com maior afinidade por FQ estão localizados espacialmente no gráfico de scores no quadrante correspondente a PC2(-). A PCA dos espectros FTIR descrevem estes HA como HA com menores proporções de grupos carboxilo disponíveis, mas com elevada proporção de grupos fenólicos, e com estruturas que assemelham a quinonas, capazes de interagir mediante o mecanismo de complexação mediado por ligação de cátions em solução.

A separação dos HA na PCA está também diretamente correlacionada com sua afinidade para com as FQ. Como apresentado na **Tabela 9**, a magnitude do  $K_D$  do HA-PVA(S2) para CIP é o dobro quando comparado com sua interação com a ENR. Este comportamento poderia ser explicado considerando que a interação deste HA com a FQ é mediada pelo nitrogênio do grupo piperazinil, sendo que esta interação é facilitada no caso da CIP (a CIP tem um grupo amino secundário, enquanto a ENR tem em sua estrutura uma amina terciária). Os HA agrupados localizados espacialmente no gráfico de scores no quadrante correspondente a PC2 (+) correspondem aos HA que possuem baixa afinidade de sorção para a CIP. Este comportamento poderia ser explicado pela composição molecular do HA (compostos altamente aromáticos) e pela interação com a FQ do tipo cátion- $\pi$ .

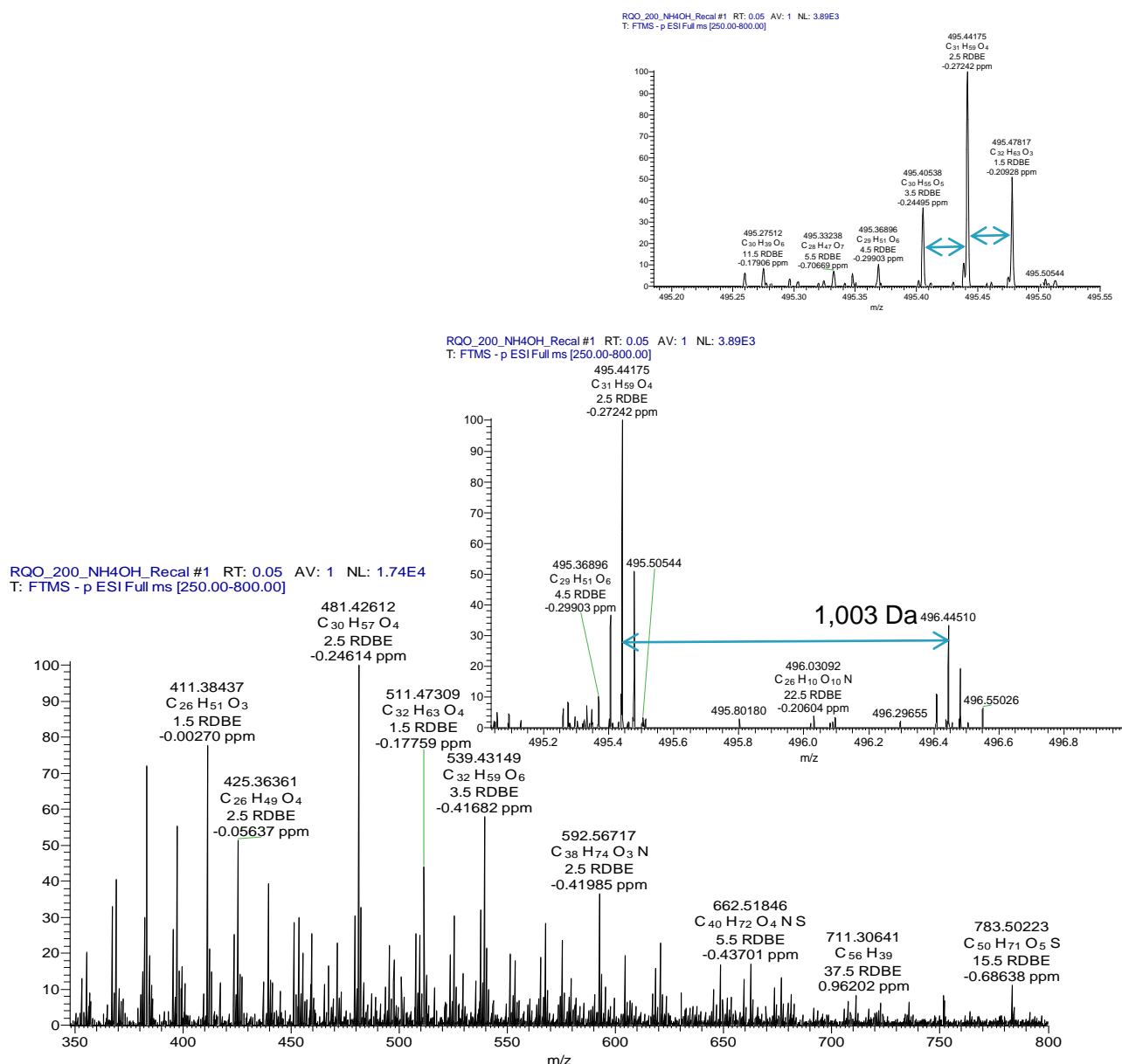
Também foi verificado que os HA dos solos LVe, RQo e PVA(S2) são HA que se distinguem por seus sinais correspondentes a grupos ácidos carboxílicos e carboidratos.

#### **IV.11. Caracterização dos HA mediante espectrometria de massas de alta resolução FT-ICR MS**

A espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) abriu uma nova possibilidade analítica para a análise da matéria orgânica. Esta ferramenta pode fornecer extensa informação molecular e elementar dos constituintes dos HA sem a necessidade de prévias separações cromatográficas (Kujawinski et al., 2001). Devido a sua ultra-alta resolução (200.000) e exatidão de massa (com valores inclusive menores que 1 ppm), a FT-ICR MS proporciona uma completa resolução de picos e permite atribuir fórmulas moleculares para cada composto. A atribuição de fórmulas moleculares é possível já que as moléculas presentes nos HA são compostas por poucos elementos abundantes, principalmente C, H e O; N e S em menor extensão.

A sucessão de reações químicas, tais como desidratação, desidrogenação, descarbonilação e descarboxilação, da matéria orgânica nos processos de humificação, origina novos compostos que contribui para a complexidade dos espectros de massa dos HA. Devido à complexidade e ao grande número de dados gerados no espectro de massas destas amostras é necessário encontrar uma forma adequada para sumarizar, visualizar e interpretar os dados.

Na **Figura 24**, é apresentado um espectro de massa característico do HA-RQo, com uma expansão na faixa de massa nominal de 495 a 496  $m/z$  e ilustrando o sinal correspondente aos isótopos  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$  em massas pares e ímpares, respectivamente.



**Figura 24** - Espectro de massas de alta resolução obtido por (+) ESI FT-ICR MS característica do HA-RQo. É apresentada também a expansão da massa nominal a 495  $m/z$ .

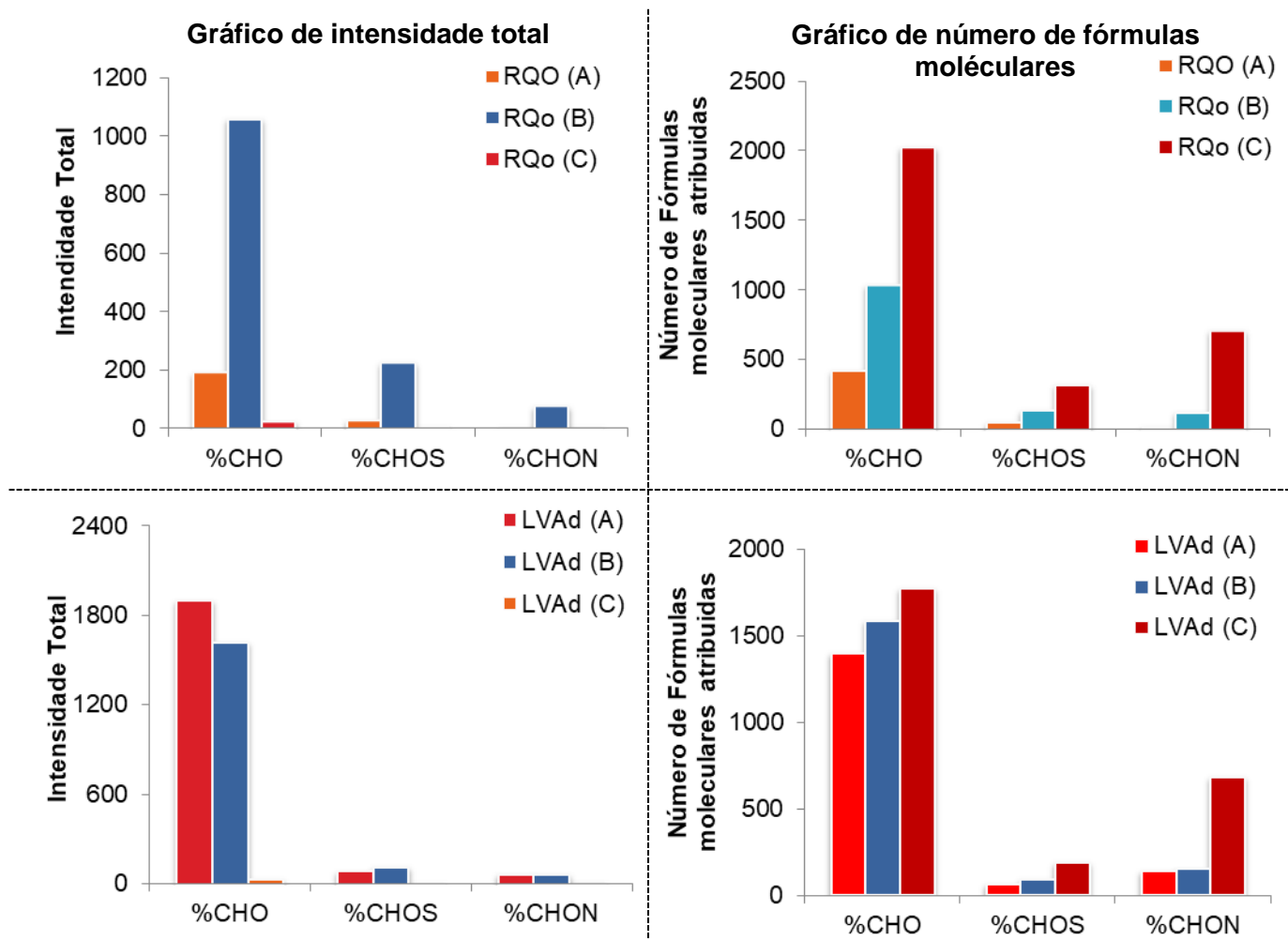
O espaçamento de 1,003 Da entre os isótopos é correspondente à massa de um nêutron, indicando que os íons são monocarregados. A expansão da massa nominal a  $m/z$  495 na **Figura 24** mostra que esses compostos apresentam espaçamentos com diferenças específicas de  $m/z$  0,0364. Diferenças sucessivas de  $\Delta m/z$  de 0,0364 unidades e intensidades formando um padrão com formato gaussiano é indicativo de que esses compostos pertencem a uma série homóloga com ganhos repetidos de um carbono mais quatro hidrogênios e perda de um

oxigênio ((CH<sub>4</sub>) 16,0313 – (O)15,9949 =  $m/z$  0,0364). Nos espectros de massas foram encontrados, também, outros tipos de séries homólogas referentes a diferenças de 2,0157 Da (H<sub>2</sub>, saturação), 14,0157 Da (CH<sub>2</sub>, grupos metila), 42,0106 Da (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, grupos oxoetil ou acetila), 44,0262 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O, grupos hidroxietil ou etoxido), e 58,0055 Da (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grupos carboximetil ou acetato).

Todos os espectros de massa dos HA extraídos apresentam um pequeno número de picos com altas intensidades e numerosos picos com baixas intensidades na faixa de massa de 200–800  $m/z$  (**Anexo 2**). Estas características são consistentes com estudos prévios de HA isolados de solos característicos do Japão (Kujawinski et al., 2001). Por exemplo, os picos correspondentes a fórmulas moleculares assinadas a lipídeos alifáticos C14:0 (C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>), C16:0 (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>), e C18:0 (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), tem uma alta eficiência de ionização no modo negativo. Entretanto, não existe correlação entre a intensidade destes sinais e as características dos tipos de solo.

#### IV.11.1. Preparo da amostra para análise por FT-ICR MS

Com o intuito de comparar se a composição dos HA atribuída mediante o método de FT-ICR MS depende do preparo da amostra, como solubilidade e/ou processos de *clean-up*, foram testados três procedimentos descritos na literatura (DiDonato et al., 2016; Kramer et al., 2004; Ohno et al., 2016). Esses procedimentos de preparo de amostra tiveram o objetivo de avaliar a solubilidade das substâncias húmicas na fase orgânica para evitar uma possível análise discriminatória de solubilidade somado a uma discriminação por ionização. Para esses ensaios foram empregados os HA extraídos dos solos RQo e LVAd. O primeiro teste (A) consistiu na solubilização do HA úmido em metanol adicionado de 20% de NH<sub>4</sub>OH; o segundo teste (B) consistiu na solubilização do HA seco e liofilizado em metanol adicionado de 20% de NH<sub>4</sub>OH e por fim, o teste 3 (C) foi idêntico ao B, no entanto, incluindo um processo adicional de *clean-up* usando resina de troca catiônica (Dowex® 50WX8). Os dados foram analisados mediante gráficos de barras de intensidade total de classes de compostos e gráficos de barras de número de fórmulas moleculares atribuídas. Os resultados para os HA dos solos RQo e LVAd estão apresentados na **Figura 25**.



**Figura 25** – Distribuição de classes de compostos e número de fórmulas moleculares atribuídas obtidos por FT-ICR MS das amostras de HA-RQo e HA-LVAd, empregando três procedimentos de preparo de amostras. Procedimento A: solubilização do HA úmido em metanol adicionado de 20% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; (B) solubilização do HA seco e liofilizado em metanol adicionado de 20% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e (C) idêntico ao B, no entanto, incluindo um processo adicional de *clean-up* usando resina de troca catiônica (Dowex® 50WX8).

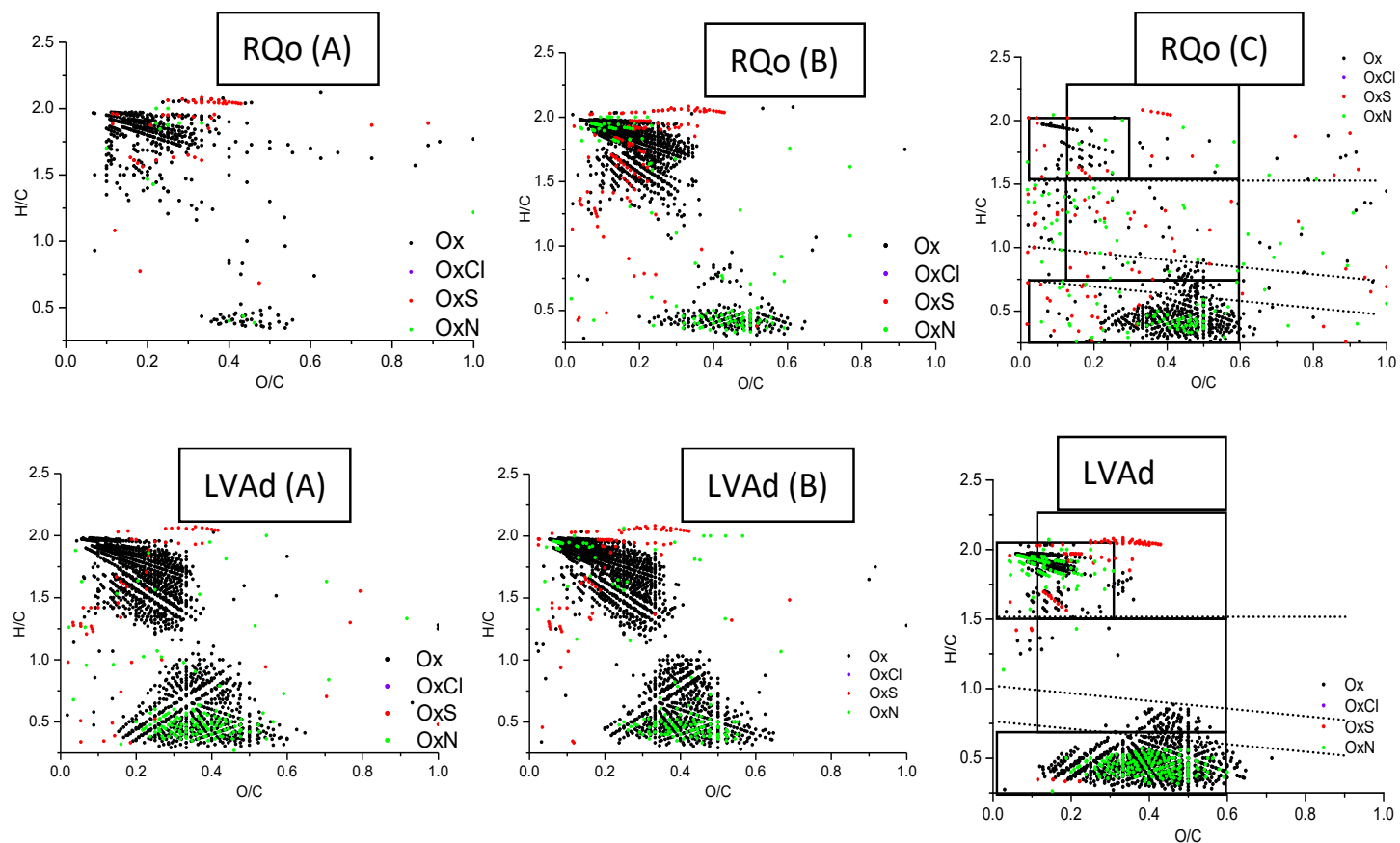
Em termos gerais usando o método de preparo de amostras B (massa seca e liofilizada), é obtido um espectro de massas com uma intensidade maior de corrente para todas as classes de compostos ( $2,7 \times 10^6$  corrente total) quando comparada com o procedimento C (*clean-up* usando resina de troca catiônica), onde a corrente iônica total do espectro é de  $8,7 \times 10^4$  (**Figura 25**).

Contudo, antes de decidir o melhor método de preparo das soluções de HA para as análises de FT-ICR MS foram construídos os diagramas de van Krevelen para cada espectro de massas resultante de cada experimento. No diagrama as fórmulas moleculares individuais são plotadas em função das razões molares H/C e O/C. Assim, cada ponto no diagrama representa fórmulas moleculares com um valor específico de H/C e O/C (Wu et al., 2004).

Na **Figura 26** se apresentam os diagramas de van Krevelen, os quais refletem as diferenças na distribuição do espectro de massas dos HA obtido de cada procedimento de preparo da amostra. Quando é realizado o *clean-up* com a resina de troca catiônica se observa um aumento principalmente na atribuição de fórmulas moleculares na região de compostos com características de compostos insaturados (H/C abaixo de 0,7) e, principalmente, contendo compostos nitrogenados e uma perda dos compostos mais saturados. É importante salientar que o processo de *electrospray* pode ser muito seletivo e que as contribuições relativas dos picos identificados talvez não sejam representativas da amostra. Neste caso, a utilização de outras técnicas, tais como NMR, ajudam a garantir quais estruturas são componentes importantes da amostra.

A comparação das regiões apresentadas nos gráficos de van Krevelen e os trabalhos recentes de caracterização de HA com esta técnica permitiu definir o procedimento (B) como o método de escolha para as análises subsequentes.

Estes resultados obtidos usando o procedimento (B) estão de acordo com Ohno et al. (2010). Os autores descrevem que a maioria dos componentes extraíveis com hidróxido de sódio se situam nas regiões H/C–O/C semelhante à dos lipídeos e na fronteira entre a lignina e os aromáticos condensados, enquanto que a região H/C e O/C, semelhantes à de lignina, são mais escassos, principalmente quando antes de se extrair com hidróxido de sódio o solo foi tratado com uma solução de ácido clorídrico (presumivelmente perda de compostos associados com cálcio) (Chen et al., 2014).



**Figura 26-** Diagramas de van Krevelen. As cores representam os tipos de compostos: preto para CHO, vermelho para CHOS, verde para CHON, azul para CHOCl. As fórmulas moleculares plotadas no diagrama podem ser classificadas em seis regiões assinadas: lipídeos ( $H/C = 1,5-2,0$ ,  $O/C = 0-0,3$ ), proteínas e outros alifáticos ( $H/C = 1,5-2,2$ ,  $O/C = 0,1-0,67$ ), ligninas ( $H/C = 0,7-1,5$ ,  $O/C = 0,1-0,67$ ), aromáticos condensados ( $H/C = 0,2-0,7$ ,  $O/C = 0-0,67$ ), carboidratos ( $H/C = 1,5-2,4$ ,  $O/C = 0,67-1,2$ ), e hidrocarboneto insaturados ( $H/C = 0,7-1,5$ ,  $O/C = 0-0,1$ ). Os métodos de preparo estão designados como A, B e C.



#### IV.11.2. Espectrometria de massas aplicada a caracterização dos ácidos húmicos

Após definido o modo de preparo das amostras para análise por FT-ICR MS, foram obtidos os espectros de massas de todas as amostras de HA, incluindo os HA extraídos dos solos coletados pela nossa equipe de pesquisa, assim como, os HA cedidos pela Embrapa do Rio de Janeiro.

Como discutido anteriormente os espectros de massas das amostras de HA apresentam centenas de sinais. A seguir, serão apresentadas algumas estratégias de visualização dos resultados que permitiram comparar a composição química das mesmas.

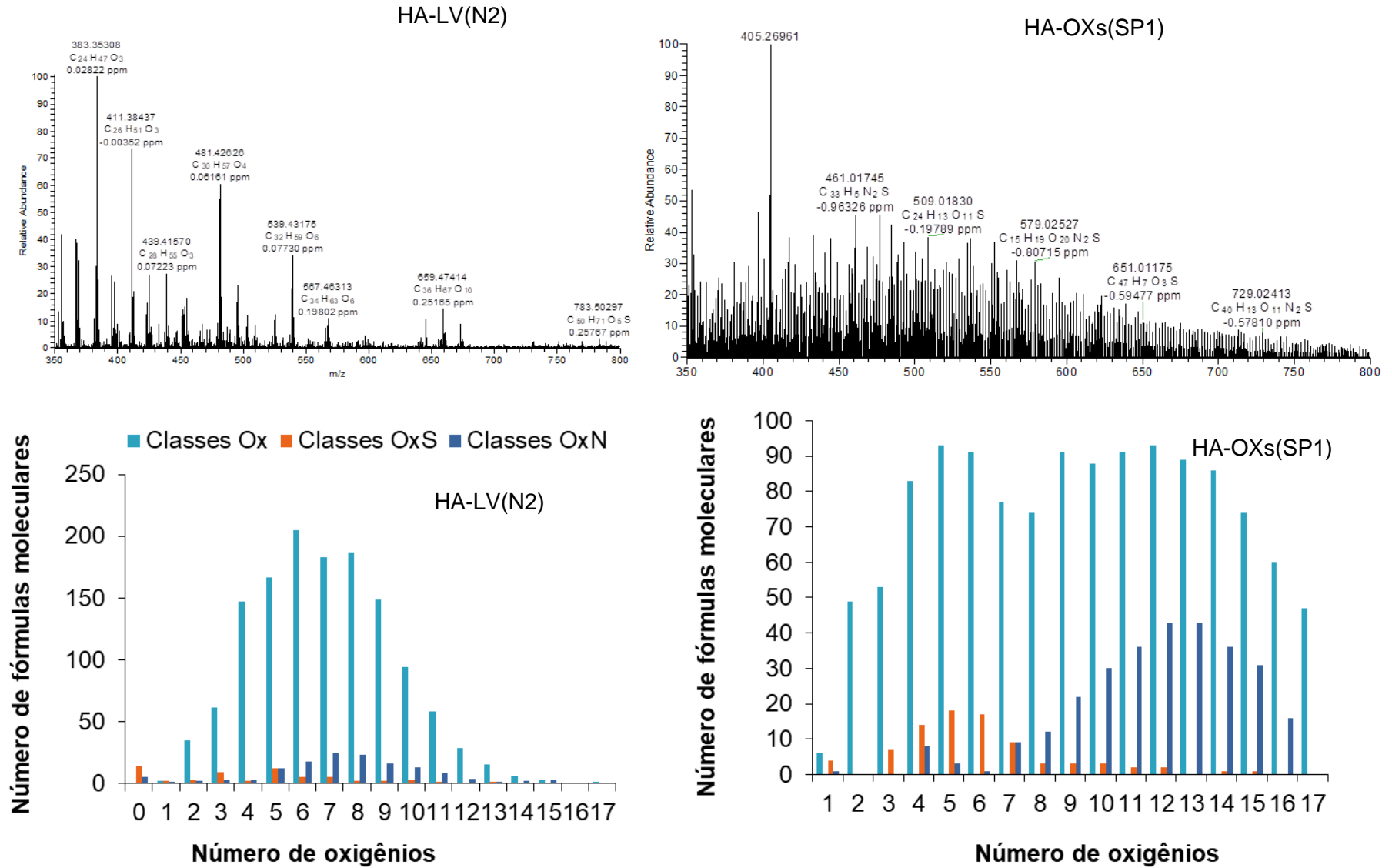
O gráfico de classes de compostos representa o número de fórmulas moleculares de cada “família de compostos” (compostos que contêm os mesmos tipos e quantidades de heteroátomos). As classes de compostos são definidas como o agrupamento de fórmulas moleculares que contêm os mesmos tipos e quantidade de heteroátomos. Para evitar ambiguidades de terminologia, todos os compostos contendo qualquer número de átomos de C, H e O foram referidos neste texto como compostos tipo CHO. De forma similar, foram denominados outros tipos de compostos, como: CHON, CHOS e CHOCI.

Na **Figura 27**, são apresentados os espectros de massas FT-ICR MS das amostras de HA-LVAd e o HA-OXs(SP1) junto com seus respectivos gráficos de classes. Os espectros de massas apresentam perfis diferenciados, que se refletem na distribuição dos tipos de compostos.

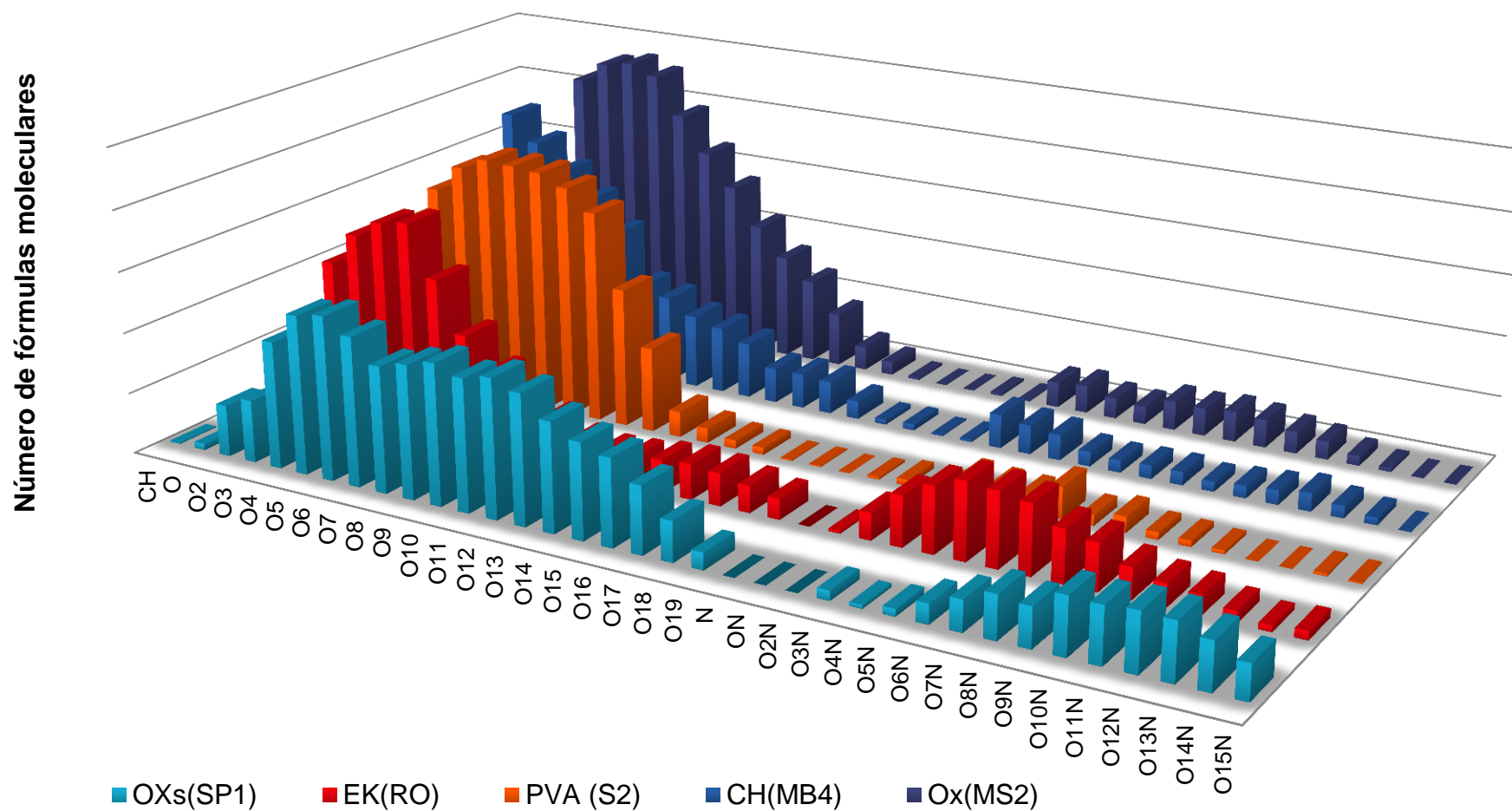
Em geral, os gráficos de classes dos HA estudados apresentaram no máximo dois tipos de heteroátomos, um deles oxigênio e o outro podendo ser enxofre ou nitrogênio. A maioria das fórmulas moleculares assinadas são compostos polioxigenados com até um único átomo de N ou S.

Para facilitar a apresentação de resultados, foram construídos os gráficos de classes para todos os espectros dos HA em estudo, os quais estão apresentados nas **Figuras 28 e 29**.

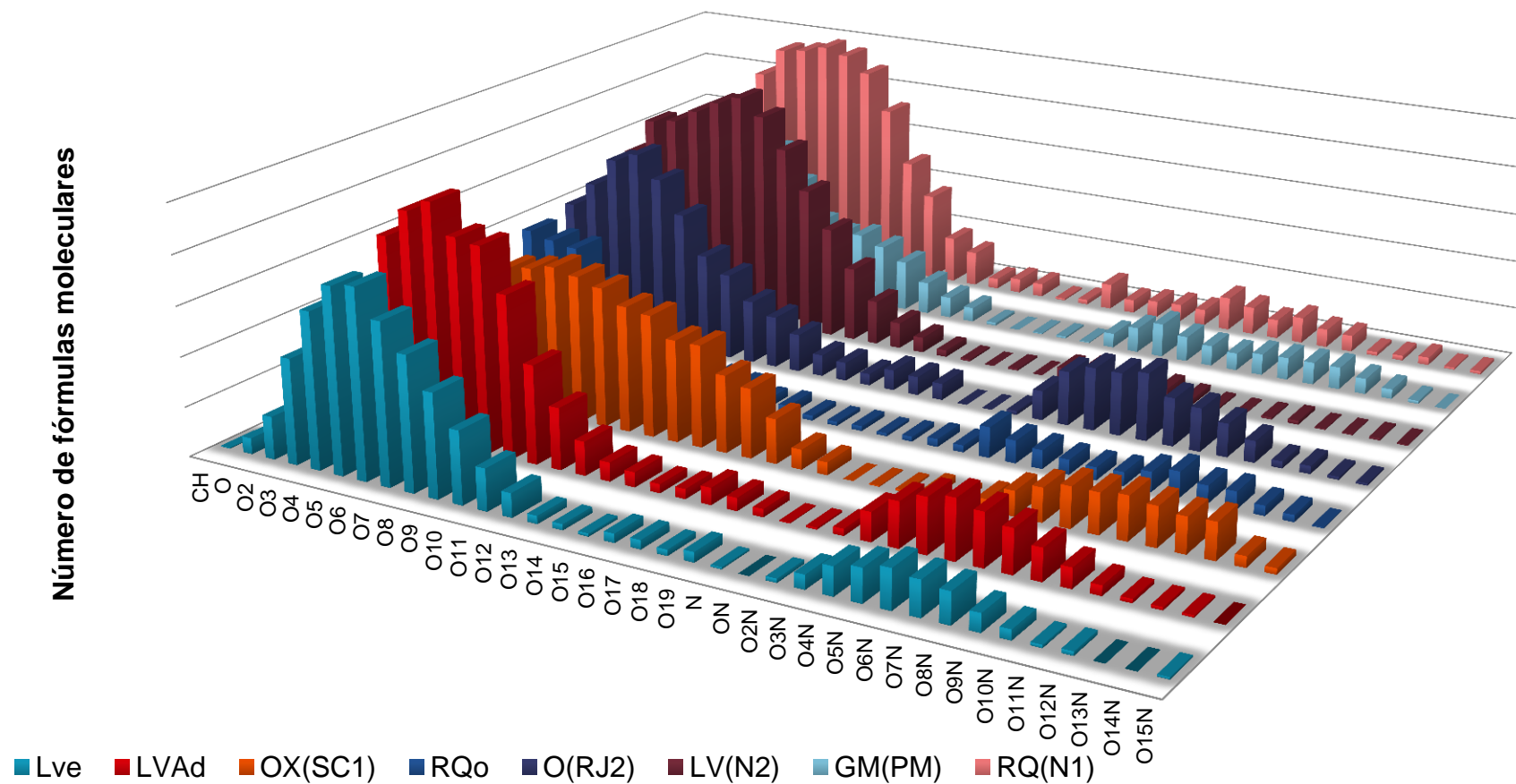
Nestas figuras são apresentados os resultados dos espectros de massas correspondentes aos HA que apresentaram uma baixa (**Figura 28**) e alta (**Figura 29**) sorção das FQ (valores apresentados na **Tabela 9**).



**Figura 27** – Espectros de massas de alta resolução obtido por (+) ESI FT-ICR MS do HA-LV(N2) e o HA-OXs(SP1).



**Figura 28** - Gráfico de barras representando o número de fórmulas moleculares correspondente a cada grupo de compostos (CHO e CHON), para os HA OXs(SP1), EK(RO), PVA(S2), CH(MB4) e OX(MS2).



**Figura 29** - Gráfico de barras representando o número de fórmulas moleculares correspondente a cada grupo de compostos (CHO e CHON). Das amostras de Lve, LVAd, OX(SC1), RQo, O(RJ2), LV(N2), GM(PM) e RQ(N1)

Destaca-se que em geral nos espectros de massas dos HA a gaussiana formada pela classe CHO está centrada em compostos com seis oxigênios (O6).

O gráfico de classes da **Figura 28** reflete a composição dos HA que apresentaram menores valores em referência a capacidade de sorção de FQ. Em geral estes HA se caracterizam por fórmulas moleculares mais polioxigenadas e com um baixo conteúdo de nitrogênio na sua estrutura.

Já os HA apresentados na **Figura 29** se destacam por apresentar fórmulas moleculares contendo no máximo 12 oxigênios (O12), e alto conteúdo de compostos polioxigenados contendo nitrogênio.

Contudo a informação extraída com o uso do gráfico de classes ainda é limitada, comparada com a informação contida nos espectros de massas de alta resolução. Ainda com esta análise de resultados não é possível a identificação da composição destas amostras, nem estabelecer relações entre composição e comportamento ambiental.

#### IV.11.3. Diagramas de van Krevelen dos HA

Uma importante ferramenta que é amplamente empregada para observar variações composicionais de dados de FT-ICR MS é o diagrama de van Krevelen. Este gráfico é construído a partir da análise da composição elementar, no qual a razão atômica H/C (obtida através da razão entre a concentração do átomo pela sua massa atômica  $H/1 \div C/12$ ) é descrita como uma função da razão atômica O/C.

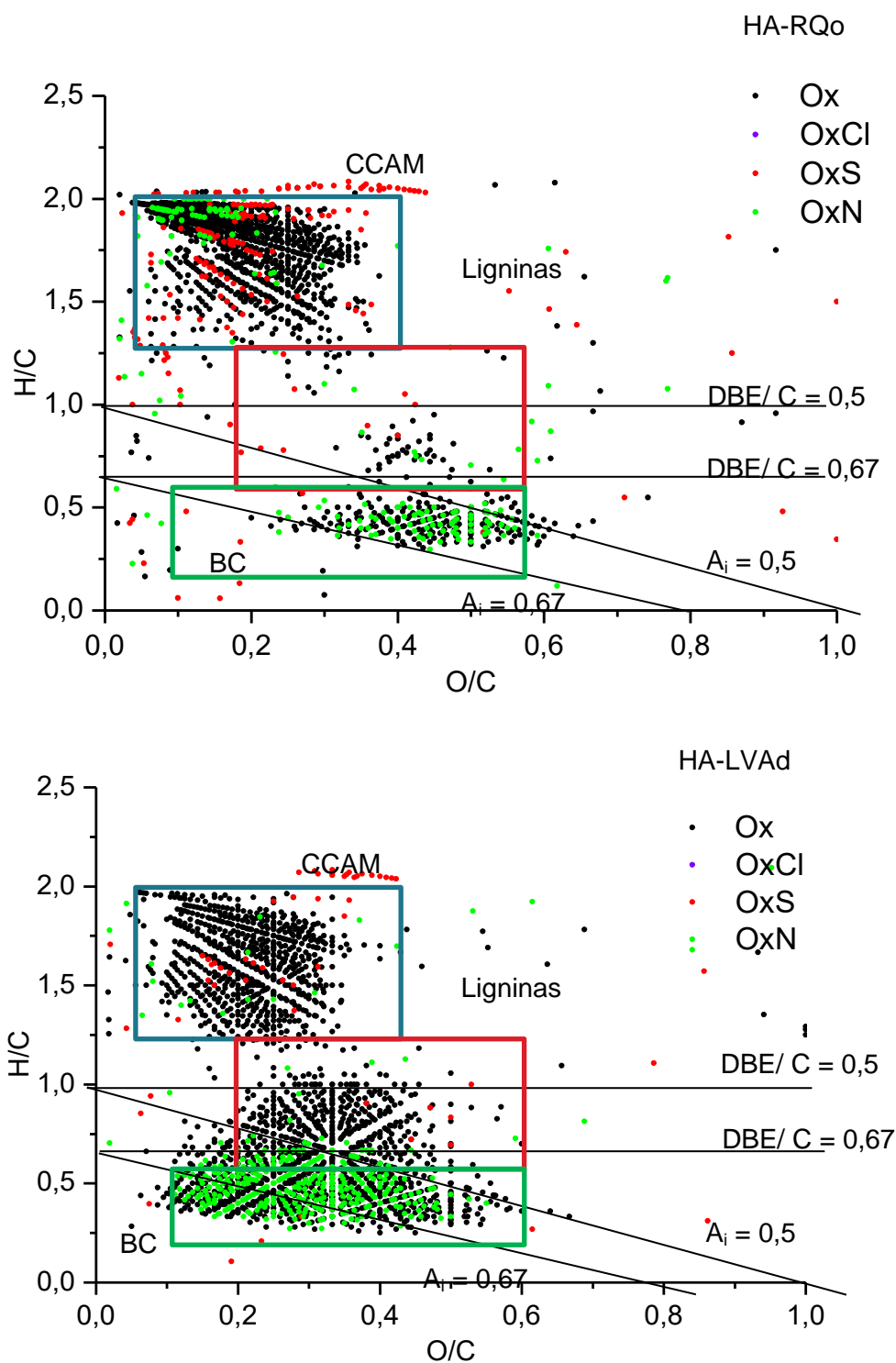
Nos últimos quatro anos as diversas pesquisas relacionadas com HA definiram que, independentemente do ecossistema, da região, do clima e da classe textural do solo em que foram extraídos, os HA apresentam a predominância de três componentes moleculares que podem ser definidos espacialmente no diagrama de van Krevelen:

- Moléculas que se assemelham estruturalmente a ligninas que se situam no diagrama de van Krevelen no  $0,2 \leq O/C \leq 0,6$ ,  $0,6 \leq H/C \leq 1,2$ , as quais são tidas como substrato principal para reações subsequentes do processo de humificação;
- Moléculas alifáticas contendo carboxilas denominadas de CCAM, que no digrama de van Krevelen estão representadas por fórmulas moleculares correspondentes a  $(0,85 \leq H/C \leq 2, O/C \leq 0,4)$ ;

- Moléculas aromáticas condensadas, as quais apresentam semelhança com o *black carbono* (BC). As moléculas reconhecidas com BC correspondem a fórmulas moleculares com valores de  $A_i$  (índice de aromaticidade) maiores que 0,67 e correspondem inequivocamente, a um composto aromático condensado (Chen *et al.*, 2014; DiDonato *et al.*, 2016; Ikeya *et al.*, 2015; Kramer *et al.*, 2004).

Apesar da FT-ICR MS não ser uma técnica quantitativa, pelos diagramas de van Krevelen é possível avaliar a abundância relativa de compostos em cada classe química presente nas amostras (Kim *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004b).

Na **Figura 30** ilustra-se o formato característico do diagrama de van Krevelen para as amostras de HA extraídas dos solos RQo e LVAd.



**Figura 30** - Diagrama de van Krevelen das amostras de HA extraído dos solos LVAd e RQo. Na figura são delimitadas as regiões correspondentes a moléculas alifáticas contendo carboxilas (CCAM), moléculas aromáticas condensadas (BC) e região de ligninas. As linhas são os limiares de 0,5 e 0,67 para DBE/C e para  $A_i$ .

Considerando a importância destas três regiões do diagrama de van Krevelen, na diferenciação estrutural dos HA e para facilitar a discussão dos resultados foi construído o gráfico da **Figura 31**. Neste gráfico se resumem as informações de todos os HA avaliados quanto a porcentagem total relativa de fórmulas atribuídas para cada amostra em cada uma das regiões determinadas pelo gráfico de van Krevelen.

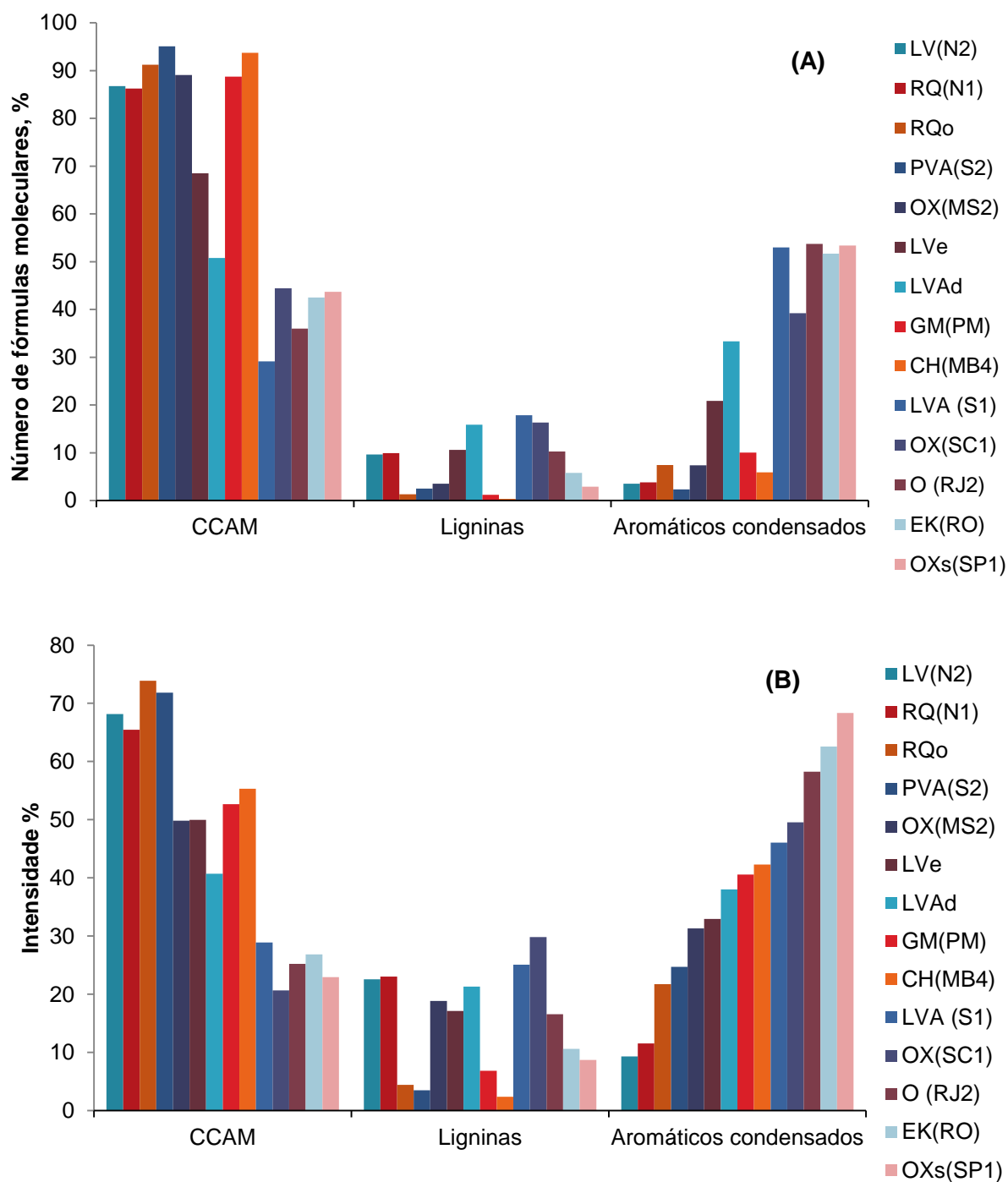
A priori algumas diferenças no conjunto de amostras se evidenciam na **Figura 31**. Fórmulas moleculares categorizadas como moléculas alifáticas contendo grupos carboxilas (CCAM) foram predominantes nos HA, tais como LV(N2), RQo, PVA(S2), GM(PM) e CH(MB4). Cabe destacar, que esta característica já tinha sido apontada na análise dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR das amostras HA-RQO e HA-PVA(S2).

Fórmulas moleculares categorizadas como compostos condensados aromáticos-BC foram predominantes nos HA, tais como LVA(S1), OX(SC1) O(RJ2), EK(RO) e OX(SP1). Estas fórmulas moleculares são definidas na literatura como compostos aromáticos com baixos valores de O/C (Kramer et al., 2004). Estes compostos são reconhecidos como produtos de combustão incompleta de combustíveis fósseis e biomassa, sendo compostos muito heterogêneos em relação ao seu tamanho, idade e composição química (Dittmar e Koch, 2006; Schmidt et al., 2009).

Nos estudos de HA relatados na literatura três tipos de entidades estruturais foram identificados como BC: compostos aromáticos linearmente fundidos, aromáticos ligados por ligações simples carbono-carbono e estruturas aromáticas altamente condensadas (fundidas) (Kim et al., 2003), assim como estruturas de anel aromático com alto conteúdo de oxigênio carboxílico (Hockaday et al., 2006; Stubbins et al., 2010).

As amostras LVA(S1), OX(SC1) e O(RJ2) se destacam porque além de apresentar um número maior de fórmulas moleculares na região do BC, também apresentam abundantes fórmulas moleculares na região denominada de ligninas. Em geral, a literatura sugere que estas fórmulas moleculares descrevem compostos de estrutura relacionada a ligninas e com alto teor relativo de substituintes fenóis poli-hídricos (Crist et al., 2002; Qi et al., 2016; Stubbins et al., 2010).





**Figura 31** - Distribuição relativa de fórmulas moleculares dos HA avaliados, referentes às três regiões identificadas no diagrama de van Krevelen (moléculas alifáticas contendo carboxila-CCAM, compostos semelhantes a lignina-LIG, e compostos condensados aromáticos-BC). (A) Número de fórmulas moleculares correspondentes a cada região do diagrama e (B) intensidade relativa das fórmulas moleculares correspondentes a cada região do diagrama.

O diagrama de van Krevelen traz consigo informação relevante da natureza química dos HA. A partir dos resultados apresentados até o momento é possível reconhecer alguns padrões estruturais que estão correlacionados com o comportamento ambiental dos HA com a sua estrutura molecular. No entanto, pelo número elevado de resultados, uma abordagem multivariada foi adotada e os resultados estão apresentados a seguir.

#### IV.12. Análise exploratória dos espectros de HA pela análise de componentes principais

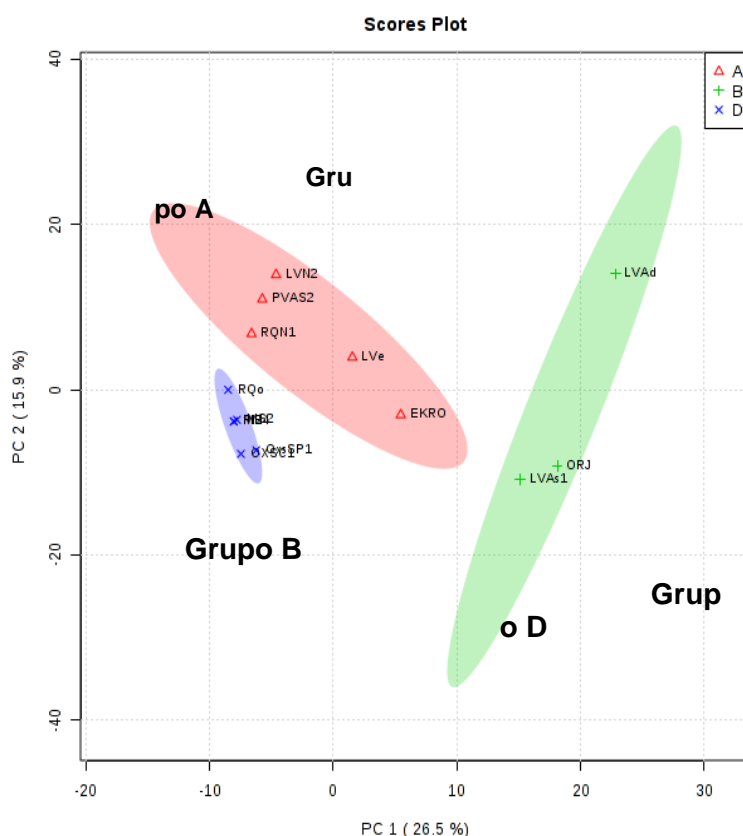
A abordagem de análise multivariada PCA e PLS-DA (Análise Discriminante e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais) foi aplicada aos dados dos espectros de massas das amostras dos HA utilizando a plataforma *on-line Metabo Analyst 2,0*.

A matriz de dados foi criada a partir das fórmulas moleculares atribuídas dos compostos CHO, CHON e CHOS junto com seus respectivos valores de abundância normalizada. Valores de magnitude igual a zero foram dados para fórmulas que não foram detectadas em algumas amostras. Os compostos CHOCI não foram incluídos na matriz devido à baixa abundância.

A **Figura 32** mostra os gráficos de *scores* do PCA aplicado a os dados dos espectros de massas obtidos por FT-ICR MS.

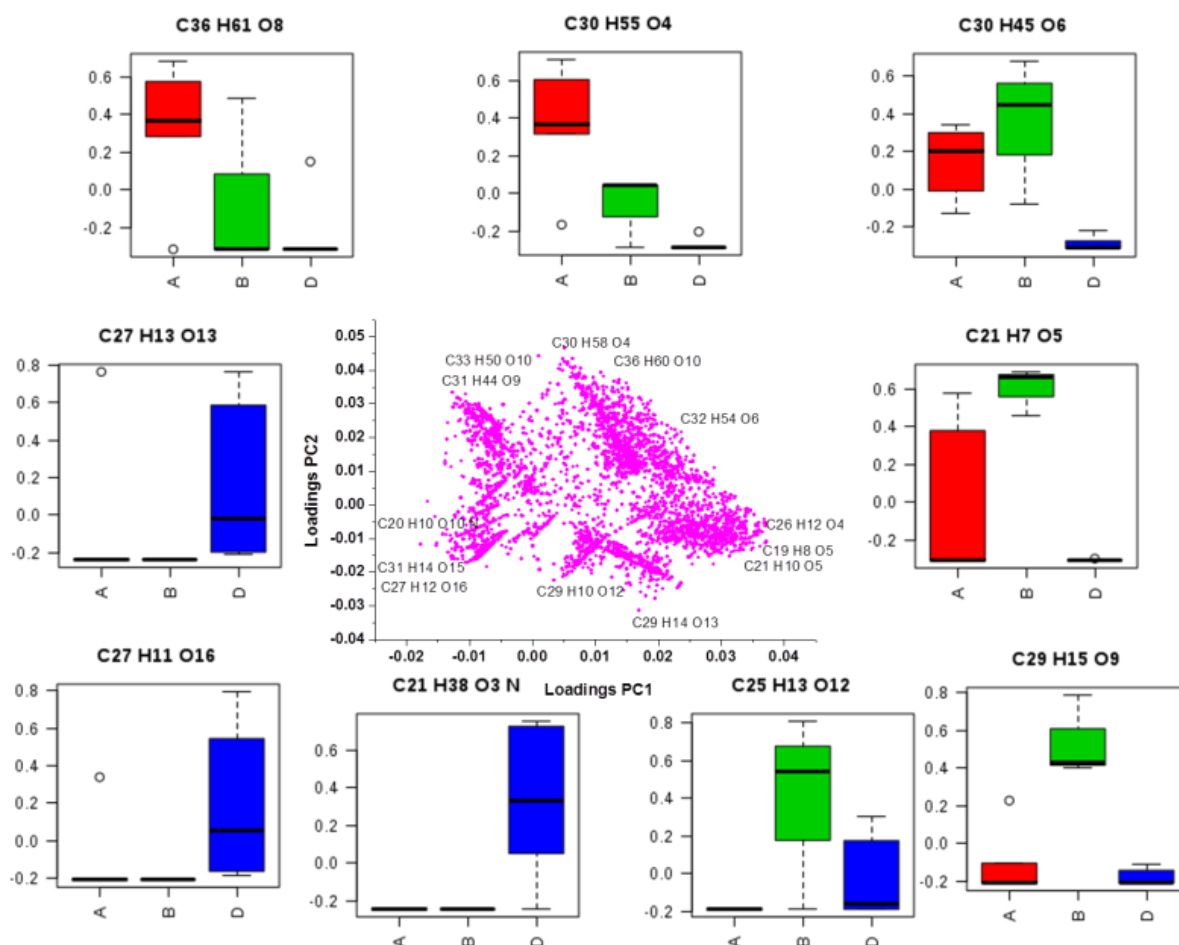
Como pode ser visto na **Figura 32** o fator 1 (26,5%) e o fator 2 (15,9%) explicaram em torno de 40% da variância. De acordo com o gráfico de *scores*, a separação do Grupo D e o Grupo B foi principalmente baseada nas variáveis relacionadas a componente 1 (PC1). Já a PC2 conseguiu diferenciar os Grupos A e B.

A análise separou as amostras em três grupos, mostrando alta similaridade entre as amostras dos HA dos solos LV(N2), PVA(S2) e RQ(N1) (Grupo A), entre as amostras de HA RQo, OX(MS2) e CH(MB4), OX(SC1) e OXs(SP1) (Grupo B) e os HA LVA(S1), O(RJ2) e LVAd (Grupo D). Destaca-se que os HA correspondentes ao Grupo 3 já tinham sido classificados como HA com elevada afinidade para sorver as FQ ( $K_D > 20000$  para ENR e CIP).



**Figura 32** - Gráfico de *scores* do PCA dos espectros de massas dos HA, O Grupo A está denotado pela cor rosa, o Grupo B pela cor roxa e Grupo D pela cor verde.

De acordo com o gráfico de *loadings* apresentado na **Figura 33**, as fórmulas moleculares que deram maior peso para a separação do Grupo A foram  $C_{36}H_{61}O_8$  e  $C_{30}H_{45}O_6$ . Estas fórmulas moleculares correspondem a compostos altamente saturados e de baixo teor de oxigênio (DBE ca 5).



**Figura 33** - Gráfico de *loadings* da análise de PCA dos espectros de massas dos HA, as fórmulas moleculares de maior peso na separação dos grupos são apresentadas mediante os gráficos de *box-plot*. Os grupos separados mediante o PCA são identificados como Grupo A, B e D.

A componente PC1 separa os Grupos B e D, sendo que esta diferença deriva, principalmente, de compostos com fórmulas moleculares tais como  $C_{25}H_{14}O_{12}$ ,  $C_{29}H_{20}O_{10}$ ,  $C_{27}H_{13}O_{13}$ ,  $C_{29}H_{16}O_9$ , e  $C_{21}H_{38}O_3N$ .

Como o intuito de elucidar as estruturais moleculares dos HA que influenciaram os agrupamentos feitos mediante as análises de PCA, foram construídos os gráficos: de classes, gráficos de defeito de massa de Kendrick (*Kendrick Mass Defect* - KMD) e os gráficos de DBE/C. Estes gráficos permitem a visualização das relações entre o conjunto de dados de fórmulas moleculares.

Na discussão serão apresentados somente os dados correspondentes aos HA que foram diferenciados na análise de PCA incluindo HA-LVAd, HA-LVA(S1), HA-LV(N2), HA-PVA(S2), HA-LVA(S1), OX(SP1), O(RJ2) e EK(RO). Neste

grupo de HA escolhidos se encontram os dois extremos em referência a capacidade de sorção.

#### IV.13. Diagrama de Kendrick

O diagrama de Kendrick resulta ser uma ferramenta útil para a correlação estrutural das fórmulas moleculares assinadas nos espectros de massas FT –ICR MS.

O padrão de espaçamento regular utilizado na análise do gráfico apresentado na **Figura 34** foi o grupo carboxílico (COO). O KMD foi calculado a partir da diferença da massa de Kendrick nominal e a massa exata de Kendrick (Equação 18). A massa exata de Kendrick é calculada pela Equação 18 e a massa nominal de Kendrick é o valor inteiro de massa exata de Kendrick arredondado para cima (Hughey et al., 2001).

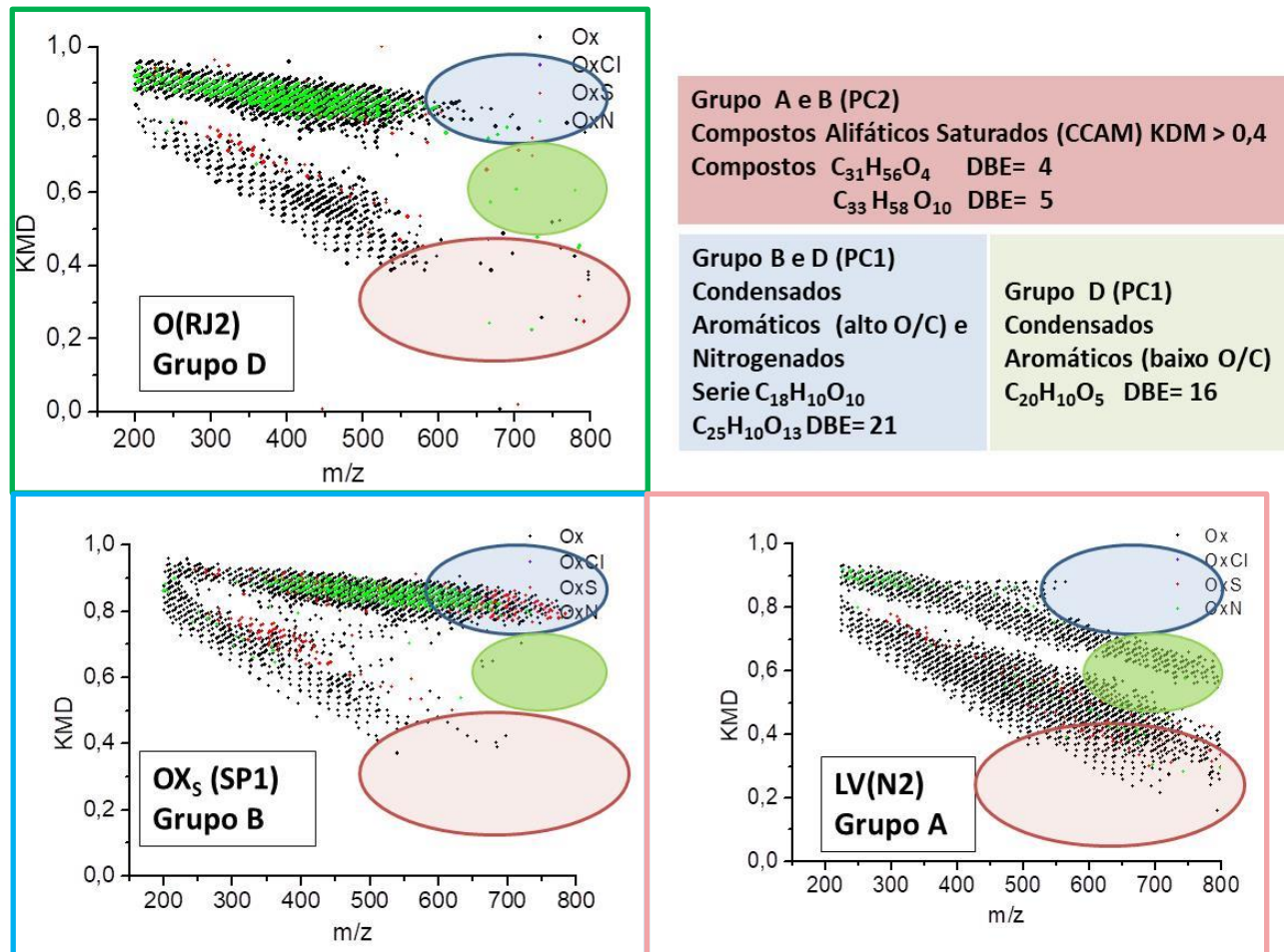
Assim, todos os compostos que pertencem a uma mesma série homóloga de COO terão valores idênticos de defeitos de massas de Kendrick (KMD), sendo compostos com a mesma constituição de heteroátomos e mesmo número de anéis e ligações duplas, diferindo somente no número de grupos COO.

$$KDM = \text{Massa de Kendrick nominal} - \text{Massa exata de Kendrick} \quad \text{Eq. 16}$$

$$\text{Massa exata de Kendrick} = \text{Massa exata} \frac{44,00000}{44,0095} \quad \text{Eq. 17}$$

Embora a análise KMD não possa fornecer evidência definitiva para a informação estrutural, este padrão de espaçamento regular reflete a presença de abundantes grupos policarboxílicos e/ou grupos éster de ácido carboxílico e hidroxilas. Estas três funcionalidades destacadas pela análise KMD estão comumente associadas com grupos funcionais de lignina degradada e, portanto, vale a pena ser discutido (Dier et al., 2016).

Nesta discussão foi escolhido como representante do Grupo A do PCA o HA-LV(N2), de Grupo B o HA-OXs(SP1) e do Grupo D o HA-O(RJ2) (**Figura 34**)



**Figura 34** Gráficos de defeito de massa de Kendrick de COO para as amostras de HA LV(N2) (Grupo a do PCA), OXs(SP1) (Grupo 2 do PCA) e O(RJ2) (grupo 3 do PCA), As cores representam os tipos de compostos, preto para CHO, vermelho para CHOS, verde para CHON, azul para CHOCl.

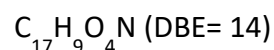
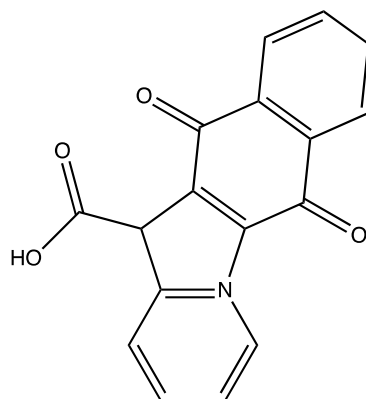
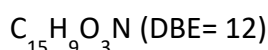
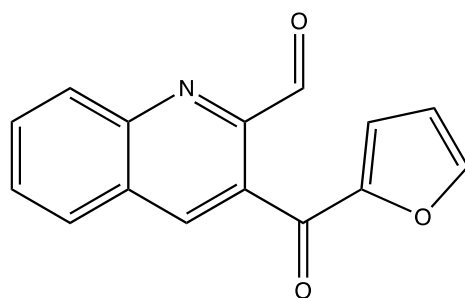
Os gráficos de Kendrick destes três HA apresentam diferenças significativas. No HA-OXs(SP1) representante do grupo B do PCA, foram identificadas fórmulas moleculares com características de compostos com alto teor de carbono, polioxigenados com altos valores de razão O/C e valores de DBE > 25 (fórmulas moleculares destacadas em azul). Um elevado DBE e um número alto de oxigênio indicam prevalência de anéis e ligações duplas na estrutura, que pode ser representado por grupos aromáticos simples, múltiplos anéis ou polienos estendidos. Este tipo de composto tinha sido sugerido em alguns trabalhos como compostos estáveis e refratários (DiDonato et al., 2016).

O HA-O(RJ2) escolhido para representar o grupo D do PCA, compartilha algumas das características do HA-OXs(SP1), no entanto, este HA tem uma alta proporção de compostos CHON e valores relativamente baixos de O/C.

A considerável deficiência de hidrogênio em conjunto com altos valores de DBE (DBE > 4) detectados nas moléculas CHON dos HA-O(RJ2) e em geral nos HA do Grupo D, sugere uma ocorrência significativa de compostos heterocíclicos nitrogenados e com baixa ocorrência de aminas alifáticas saturadas e insaturadas, o que implica que durante a formação destas moléculas houve uma continua adição de moléculas CHN hidrogênio deficientes que teria contribuído para limitar a razão média de H/C para níveis intermediários ou baixos (Schmitt-Kopplin et al., 2010).

O gráfico de Kendrick do espectro de massas do HA-LV(N2) mostra que compostos altamente saturados e de baixo teor de oxigênio (DBE ca 10) são predominantes nesta amostra (estas fórmulas moleculares estão ressaltadas na cor rosa na **Figura 34**). Esta característica já tinha sido apontada no gráfico de classes da **Figura 31**.

Estas observações chamaram a atenção para as moléculas identificadas nos espectros de massas  $C_{15}H_9O_3N$  (DBE= 12),  $C_{17}H_9O_4N$  (DBE= 14), que são coerentes com estruturas do grupo de BC (*black carbon*). Na **Figura 35** são apresentadas possíveis fórmulas estruturais representativas destas fórmulas moleculares, as quais já foram descritas por alguns autores quando foram avaliadas amostras de BC (Kong et al., 2015).



**Figura 35-** Possíveis formas estruturais, correspondentes às fórmulas moleculares identificadas como principais responsáveis de promover a sorção de FQ em HA do solo.

Na literatura compostos do tipo fenantrolina foram descritas por Fernandes et al. (2014) como sítios de interação específica para formação de complexos ternários metálicos com FQ. Os autores propõem que os complexos ternários entre FQ e estes compostos heterocíclicos são mais estáveis do que os complexos binários formados com outros ligantes, sugerindo que essa estabilização é decorrente da interação intra-molecular entre os ligantes. No entanto, com as condições de tratamento de dados adotadas neste trabalho não foi possível a identificação de compostos contendo dois nitrogênios e, portanto, compostos de semelhança estrutural com a fenantrolina não puderam ser incluídos na caracterização dos HA.

#### IV.14. Gráficos de DBE/C

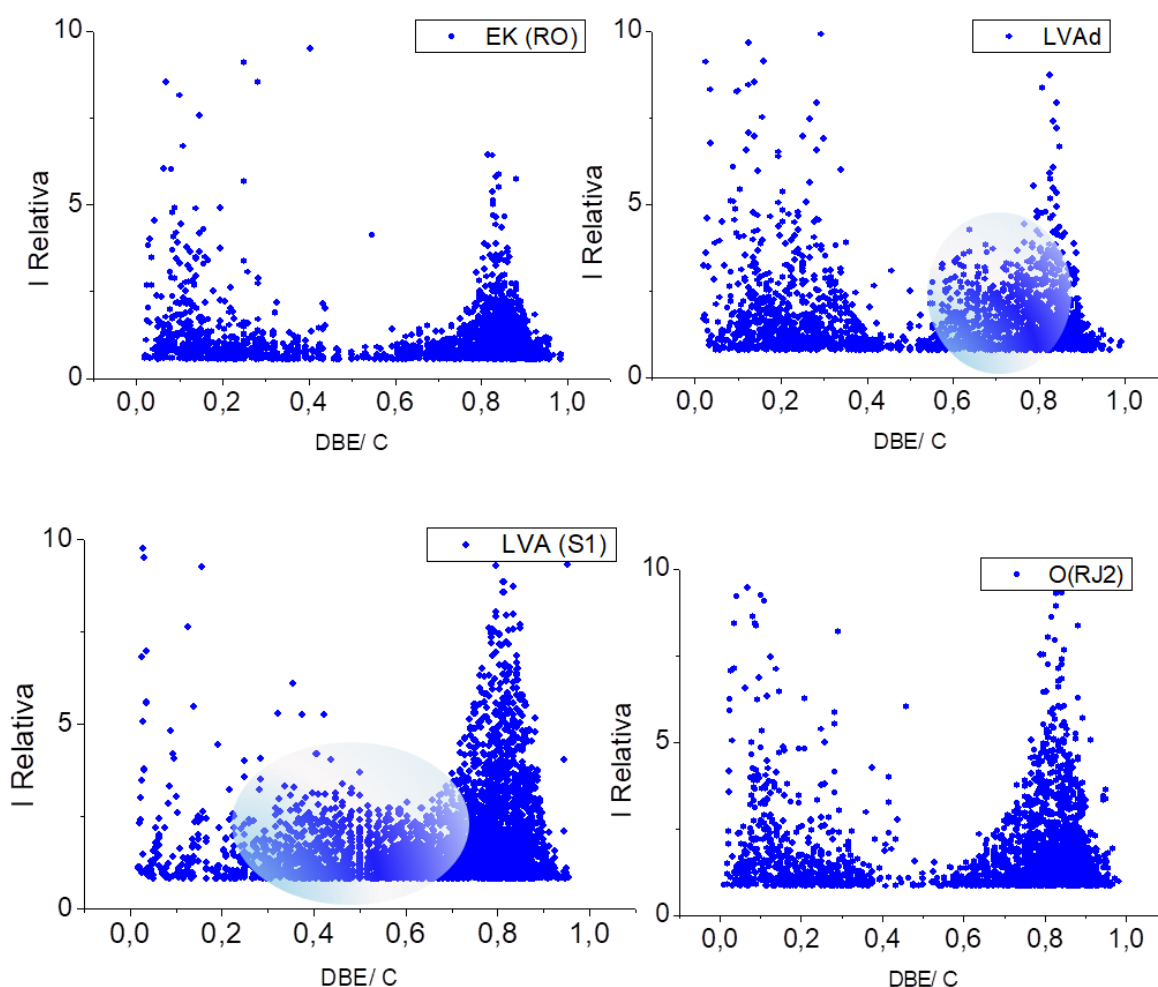
Os gráficos de DBE/C vs intensidade relativa para cada fórmula molecular atribuída no espectro de massas foram construídos para auxiliar na identificação dos domínios moleculares característicos das amostras de HA.

Esta análise gráfica foi aplicada para os HA identificados como sorventes de alta afinidade por FQ (LVAd e LVA(S1) com  $K_{D \text{ ENR e CIP}} > 10000$  e



representado no PCA como Grupo 3), HA com potencial de sorção intermediária, como o HA-PVA(S2) e o HA-EK(RO) que não tem afinidade relevante por FQ.

De acordo com Hertkorn et al. (2006) e Stubbins et al. (2010) existem três regiões do gráfico DBE/C vs intensidade relativa que podem fornecer informações úteis: a região de DBE/C entre 0,3 e 0,7, a região  $< 0,3$  e a região  $> 0,7$ .



**Figura 36** Gráficos de DBE/C vs intensidade relativa para cada fórmula molecular atribuída.

Assim destaca-se na **Figura 36** a alta abundância de fórmulas moleculares na região compreendida entre DBE:C de 0,3-0,8 no HA-LVA(S1). Esta região é descrita na literatura como moléculas que compartilham características estruturais de terpenóides (isoprenóides, esteróis e hopanóides). Esta região também é constituída por uma mistura complexa de ácidos carboxílicos e estruturas alicíclicas fundidas com uma relação carboxila-C:alifático-C de 1:2 a 1:7 (Hertkorn et

al. 2006). Espera-se que as presenças destes compostos nos HA facilitem a ligação com metais, e a coordenação múltipla através de cátions.

A ausência de compostos definidos nesta região é observada nos HA que expressam menor afinidade por FQ, tais como os HA dos solos EK(RO) e PVA(S2).

#### **IV.15. Possíveis relações entre estrutura molecular e potencial de sorção**

As diversas técnicas espectroscópicas em conjunto com a abordagem da análise multivariada permitiram determinar algumas das características estruturais dos HA em estudo.

Foram encontradas algumas relações diretas entre o teor relativo de tipos de estruturas na composição dos HA e o potencial de sorção exibido em relação aos antimicrobianos da família das FQ e SA:

- A intensa sorção das FQ no pH natural dos solos brasileiros, não é determinada pela presença de grupos ácidos carboxílicos. Os resultados das análises dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR, FT IR e FT-ICR MS corroboram essa afirmação;
- HA que contêm compostos de alto teor de carbono (poliaromáticos condensados), polioxigenados com altos valores de razão O/C e compostos com altos valores de DBE (ca 25) apresentam pouca afinidade pelas FQ e, em consequência, esses HA apresentam um baixo potencial de sorção para estas moléculas.
- Os HA extraídos dos solos LVA(S1), LVAd e O(RJ2) apresentaram os maiores valores de coeficientes de sorção para FQ, e foram agrupados por similitude estrutural na análise de PCA (Grupo D) aplicado aos espectros de massas obtido por FT-ICR MS, o qual permite inferir que a composição química está diretamente correlacionada com o potencial de sorção de FQ.
- Os resultados indicam que a característica estrutural que exerce maior significância na capacidade de sorção das FQ pelos HA está correlacionada a proporção de compostos heterocíclicos nitrogenados e hidrogênio deficientes e por grupos aromáticos simples contendo número limitado de grupos funcionais contendo oxigênio.

## V. CONCLUSÕES

Em relação à sorção dos fármacos nos HA o mesmo protocolo do Guia OECD 106 para solos pode ser empregado. As isotermas de sorção das FQ nos HA seguem o mesmo perfil do que as de sorção em solos. A sorção de FQ no material húmico (ácido húmico) extraídos dos solos: Latossolos, Neossolos, Podzólicos, Organossolos e Cambissolos revelaram valores de coeficientes de sorção ( $K_F$ ) na faixa de 5000 a 27000  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$  sugerindo uma alta afinidade de interação das FQ com os HA, quando comparado com as sulfonamidas (sulfoquinoxalina, 1030  $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1} \leq K_F \leq 853 \mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$ ). A alta dispersão nos valores de coeficientes de sorção permitiu inferir que os HA dos solos brasileiros têm uma ampla diversidade estrutural que influencia seu comportamento ambiental.

A técnica de FT-ICR MS se mostrou promissora na caracterização, a nível molecular, dos HA. A análise dos diversos tratamentos de dados empregados, como: gráficos de classes, diagramas de van Krevelen, defeito de massa de Kendrick e a abordagem da análise multivariada PCA aplicado aos dados dos espectros de massas de alta resolução, permitiram evidenciar características estruturais que mediam o processo de sorção das FQ nos HA. Os resultados indicam que a característica estrutural que exerce maior significância na capacidade de sorção está correlacionada a proporção de compostos heterocíclicos nitrogenados e hidrogênio deficientes, e por grupos aromáticos simples contendo número limitado de grupos funcionais contendo oxigênio.

No entanto, a caracterização dos HA a nível molecular é ainda um desafio. Neste trabalho, assim como, na maioria dos trabalhos reportados na literatura não foi realizada a análise dos HA combinando os modos de ionização (-) ESI e (+) ESI, sendo que a abordagem no modo positivo seria de especial interesse considerando o alto grau de aromaticidade das moléculas de HA dos solos avaliados. As principais limitações para incluir esta abordagem é o processo de interpretação dos resultados, que só se faz possível pelo emprego de tratamentos matemáticos e quimiométricos e ainda, não existe software disponível comercialmente que propicie uma interpretação direta dos dados obtidos.

Assim mesmo, neste trabalho não foi possível identificar compostos nitrogenados contendo mais de um nitrogênio na sua estrutura, sendo que esta limitação é decorrente da impossibilidade de examinar a presença do sinal

proveniente do isótopo que permitisse validar estas fórmulas moleculares. Portanto, novamente se ressalta a importância de desenvolver sistemas de tratamento de dados automatizados que permitam explorar os milhares de sinais nos espectros de HS.

Das diversas técnicas analíticas usadas neste trabalho para a caracterização estrutural dos HA, os resultados das espectroscopias de  $^{13}\text{C}$  NMR no estado sólido e espectrometria de massas de ultra-alta resolução, permitiram determinar os principais grupos funcionais presentes nos HA isolados e estão em concordância com os resultados obtidos mediante espectroscopia FTIR. Estes resultados resultaram interessantes e apontaram a espectroscopia FTIR como uma poderosa ferramenta analítica para a diferenciação estrutural das HS. Essa técnica tem como vantagem o menor custo e simplicidade de operação em comparação as outras técnicas avaliadas neste trabalho. Cabe destacar que os resultados obtidos em conjunto com a análise quimiométrica estiveram em concordância com o comportamento ambiental exibido dos HA frente a sorção de FQ.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulla, H.A.N., Sleighter, R.L., Hatcher, P.G., 2013. Two Dimensional Correlation Analysis of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra of Dissolved Organic Matter: A New Graphical Analysis of Trends. *Analytical Chemistry* 85, 3895-3902.

Ahmed, A.A., Thiele-Bruhn, S., Leinweber, P., Kühn, O., 2016. Towards a molecular level understanding of the sulfanilamide-soil organic matter-interaction. *Science of The Total Environment* 559, 347-355.

Al-Faiyz, Y.S.S., 2013. CPMAS <sup>13</sup>C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arabian Journal of Chemistry*.

Alcântara, F.A.d., Buurman, P., Curi, N., Neto, A.E.F., Lagen, B.v., Meijer, E.L., 2004. Changes in soil organic matter composition after introduction of riparian vegetation on shores of hydroelectric reservoirs (Southeast of Brazil). *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1497-1508.

Alexy, R., Kumpel, T., Kummerer, K., 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57, 505-512.

Anđelković , T., Perović, J., Purenović , M., Anđelković, D., 2004. Destabilization and aggregation of aqueous humic acids solution by metal ions. *Facta Universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology* 3, 6.

Andersson, M.I., MacGowan, A.P., 2003. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 1-11.

Aristilde, L., Sposito, G., 2010. Binding of ciprofloxacin by humic substances: A molecular dynamics study. *Environmental and Toxicology Chemistry*. 29, 90-98.

Aristilde, L., Sposito, G., 2013. Complexes of the antimicrobial ciprofloxacin with soil, peat, and aquatic humic substances. *Environmental and Toxicology Chemistry*. 32, 1467-1478.

Baidoo, E., Ephraim, J.H., Darko, G., Akoto, O., 2014. Potentiometric studies of the acid–base properties of tropical humic acids. *Geoderma* 217–218, 18-25.

Baigorri, R., Zamarreno, A.M., Fuentes, M., Gonzalez-Gaitano, G., Garcia-Mina, J.M., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., 2008. Multivariate statistical analysis of mass spectra as a tool for the classification of the main humic substances according to their structural and conformational features. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5480-5487.

Benedetti, M.M., Curi, N., Sparovek, G., de Carvalho Filho, A., Silva, S.H.G., 2011. Updated Brazilian's georeferenced soil database—an improvement for international scientific information exchanging, *Principles, Application and Assessment in Soil Science*. InTech.

Benites, V.M., Mendonça, E.S., Schaefer, C.E.R., Martin Neto, L., 1999. Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um latossolo vermelho-amarelo e de um podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 23, 543-551.

Bernier, S.P., Surette, M.G., 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in Microbiology* 4, 20.

Bialk, H.M., Simpson, A.J., Pedersen, J.A., 2005. Cross-Coupling of Sulfonamide Antimicrobial Agents with Model Humic Constituents. *Environmental Science & Technology* 39, 4463-4473.

Boeni, M., Bayer, C., Dieckow, J., Conceição, P.C., Dick, D.P., Knicker, H., Salton, J.C., Macedo, M.C.M., 2014. Organic matter composition in density fractions of Cerrado Ferralsols as revealed by CPMAS <sup>13</sup>C NMR: Influence of

pastureland, cropland and integrated crop-livestock. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 190, 80-86.

Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters* 131.

Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S., 2006. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2288-2297.

Brown, T.L., Rice, J.A., 2000. Effect of experimental parameters on the ESI FT-ICR mass spectrum of fulvic acid. *Analytical Chemistry* 72, 384-390.

Calegari, M.R., Madella, M., Vidal-Torrado, P., Pessenda, L.C.R., Marques, F.A., 2013. Combining phytoliths and  $\delta^{13}\text{C}$  matter in Holocene palaeoenvironmental studies of tropical soils: An example of an Oxisol in Brazil. *Quaternary International* 287, 47-55.

Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S., Posner, A.M., 1972. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *Journal of Soil Science* 23, 394-408.

Canellas, L.P., Berner, P.G., Silva, S.G.d., Silva, M.B.e., Santos, G.d.A., 2000. Frações da matéria orgânica em seis solos de uma topossequência no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35, 133-143.

Canellas, L.P., Santos, G.d.A., Rumjanek, V.M., Moraes, A.A., Guridi, F., 2001. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36, 1529-1538.

Cantas, L., Shah, S.Q.A., Cavaco, L.M., Manaia, C.M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H., 2013. A brief multi-

disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology* 4, 96.

Carmosini, N., Lee, L.S., 2009. Ciprofloxacin sorption by dissolved organic carbon from reference and bio-waste materials. *Chemosphere* 77, 813-820.

Carrasquillo, A.J., Bruland, G.L., MacKay, A.A., Vasudevan, D., 2008. Sorption of Ciprofloxacin and Oxytetracycline Zwitterions to Soils and Soil Minerals: Influence of Compound Structure. *Environmental Science & Technology* 42, 7634-7642.

Celano, G., Smejkalova, D., Spaccini, R., Piccolo, A., 2008. Interactions of three s-triazines with humic acids of different structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7360-7366.

Celiz, M.D., Tso, J., Aga, D.S., 2009. Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2473-2484.

Čežíková, J., Kozler, J., Madronová, L., Novák, J.r., Janoš, P., 2001. Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field: II Metal-binding capacity under static conditions. *Reactive and Functional Polymers* 47, 111-118.

Chen, H., Abdulla, H.A.N., Sanders, R.L., Myneni, S.C.B., Mopper, K., Hatcher, P.G., 2014. Production of Black Carbon-like and Aliphatic Molecules from Terrestrial Dissolved Organic Matter in the Presence of Sunlight and Iron. *Environmental Science & Technology Letters* 1, 399-404.

Chen, H., Ma, L.Q., Gao, B., Gu, C., 2013. Effects of Cu and Ca cations and Fe/Al coating on ciprofloxacin sorption onto sand media. *Journal of Hazardous Materials* 252–253, 375-381.

Chen, J., LeBoeuf, E.J., Dai, S., Gu, B., 2003. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50, 639-647.



Chilom, G., Chilom, O., Rice, J.A., 2008. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 1528-1532.

Christl, I., 2012. Ionic strength-and pH-dependence of calcium binding by terrestrial humic acids. *Environmental Chemistry* 9, 89-96.

Clark Ehlers, G.A., Forrester, S.T., Scherr, K.E., Loibner, A.P., Janik, L.J., 2010. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption behaviour of pentadecane as determined by PLS analysis of mid-infrared DRIFT and solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra. *Environmental Pollution* 158, 285-291.

Codex Alimentarius Commission. 38th Session of the Codex Alimentarius Commission. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/en/>. Acesso em junho de 2017.

Conkle, J.L., Lattao, C., White, J.R., Cook, R.L., 2010. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. *Chemosphere* 80, 1353-1359.

Cooper, K.M., McMahon, C., Fairweather, I., Elliott, C.T., 2015. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective††This paper is one of a series of reviews on “Climate Change and Food Safety – an Island of Ireland perspective”. *Trends in Food Science & Technology* 44, 21-35.

Costa, A.C.S., Bigham, J.M., Tormena, C.A., Pintro, J.C., 2004. Clay mineralogy and cation exchange capacity of Brazilian soils from water contents determined by thermal analysis. *Thermochimica Acta* 413, 73-79.

Courtier-Murias, D., Farooq, H., Longstaffe, J.G., Kelleher, B.P., Hart, K.M., Simpson, M.J., Simpson, A.J., 2014. Cross polarization-single pulse/magic angle spinning (CPSP/MAS): A robust technique for routine soil analysis by solid-state NMR. *Geoderma* 226–227, 405-414.

Crist, R.H., Martin, J.R., Crist, D.R., 2002. Heavy Metal Uptake by Lignin: Comparison of Biotic Ligand Models with an Ion-Exchange Process. *Environmental Science & Technology* 36, 1485-1490.

Cunha, T., Novotny, E., Madari, B., Martin-Neto, L., de O Rezende, M., Canelas, L., de M Benites, V., 2009. Spectroscopy Characterization of Humic Acids Isolated from Amazonian Dark Earth Soils (Terra Preta De Índio), in: Woods, W.I., Teixeira, W.G., Lehmann, J., Steiner, C., WinklerPrins, A., Rebellato, L. (Eds.), *Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 363-372.

De Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S.P., Pokludová, L., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*.

de Carvalho, A.M., Marchão, R.L., Bustamante, M.M.C., de Alcântara, F.A., Coser, T.R., 2014. Characterization of cover crops by NMR spectroscopy: Impacts on soil carbon, nitrogen and phosphorus under tillage regimes. *Revista Ciencia Agronomica* 45, 968-975.

de Oliveira Neto, O.F., Arenas, A.Y., Fostier, A.H., 2017. Sorption of thiabendazole in sub-tropical Brazilian soils. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 16503-16512.

Dias, B.d.O., Silva, C.A., Soares, E.M.B., Bettiol, W., Guerreiro, M.C., Belizário, M.H., 2009. Infravermelho na caracterização de ácidos húmicos de latossolo sob efeito de uso contínuo de lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33, 885-894.

Dick, D.P., Mangrich, A.S., Menezes, S.M.C., Pereira, B.F., 2002. Chemical and spectroscopical characterization of humic acids from two South Brazilian coals of different ranks. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13, 177-182.

Dick, D.P., Santos, J.H.Z., Ferranti, E.M., 2003. Chemical characterization and infrared spectroscopy of soil organic matter from two southern brazilian soils. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 27, 29-39.

DiDonato, N., Chen, H., Waggoner, D., Hatcher, P.G., 2016. Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 178, 210-222.

Dieckow, J., Mielniczuk, J., Knicker, H., Bayer, C., Dick, D.P., Kögel-Knabner, I., 2005. Composition of organic matter in a subtropical Acrisol as influenced by land use, cropping and N fertilization, assessed by CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 56, 705-715.

Dier, T.K.F., Egele, K., Fossog, V., Hempelmann, R., Volmer, D.A., 2016. Enhanced Mass Defect Filtering To Simplify and Classify Complex Mixtures of Lignin Degradation Products. *Analytical Chemistry* 88, 1328-1335.

Dittmar, T., Koch, B.P., 2006. Thermogenic organic matter dissolved in the abyssal ocean. *Marine Chemistry* 102, 208-217.

Dobbss, L.B., Rumjaneck, V.M., Baldotto, M.A., Velloso, A.C.X., Canellas, L.P., 2009. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33, 51-63.

Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., 2007. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Journal of Environmental Quality* 36, 1224-1230.

Doretto, K.M., Peruchi, L.M., Rath, S., 2014. Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils. *Science of the total Environment* 476–477, 406-414.

Doretto, K. M. e Rath, S., 2013. Sorption of sulfadiazine on Brazilian soils. *Chemosphere*, v. 90, 2027-2034.

Du, L., Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32, 309-327.

EMA. European Medicines Agency. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL 38. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, 2008.

Fernandes, P., Sousa, I., Cunha-Silva, L., Ferreira, M., de Castro, B., Pereira, E.F., Feio, M.J., Gameiro, P., 2014. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) lomefloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* 131, 21-29.

Fernandez-Bayo, J.D., Nogales, R., Romero, E., 2008. Evaluation of the sorption process for imidacloprid and diuron in eight agricultural soils from southern Europe using various kinetic models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5266-5272.

Fontana, A., Benites, V.d.M., Pereira, M.G., Anjos, L.H.C.d., 2008a. Substâncias húmicas como suporte à classificação de solos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32, 2073-2080.

Fontana, A., Pereira, M.G., Cunha dos Anjos, L.H., de Melo Benites, V., 2008b. Distribution of Organic Carbon in the Humic Fractions of Diagnostic Horizons from Brazilian Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39, 951-971.

Founou, L.L., Founou, R.C., Essack, S.Y., 2016. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology* 7, 1881.

Gao, J., Pedersen, J.A., 2005. Adsorption of Sulfonamide Antimicrobial Agents to Clay Minerals. *Environmental Science & Technology* 39, 9509-9516.

Gao, J., Pedersen, J.A., 2010. Sorption of Sulfonamide Antimicrobial Agents to Humic Acid–Clay Complexes All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. *Journal of Environmental Quality* 39, 228-235.

Gonzalez Ronquillo, M., Angeles Hernandez, J.C., 2017. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control* 72, Part B, 255-267.

Gonzalez Vila, F.J., Lentz, H., 1976. FT-C13 nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72, 1063-1070.

Gu, C., Karthikeyan, K.G., 2005. Sorption of the Antimicrobial Ciprofloxacin To Aluminum and Iron Hydrous Oxides. *Environmental Science & Technology* 39, 9166-9173.

Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A., 2007. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere* 66, 1494-1501.

Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E., 1981. Aromaticity of Humic Substances in Soils<sup>1</sup>. *Soil Science Society of America Journal* 45, 1089-1094.

Hayes, M.H.B., Clapp, C.E., 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science* 166, 723-737.

Hedges, J.I., Eglinton, G., Hatcher, P.G., Kirchman, D.L., Arnosti, C., Derenne, S., Evershed, R.P., Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Littke, R., Michaelis, W., Rullkötter, J., 2000. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry* 31, 945-958.

Heeren, R.M., Kleinnijenhuis, A.J., McDonnell, L.A., Mize, T.H., 2004. A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 1048-1058.

Hertkorn, N., Benner, R., Frommberger, M., Schmitt-Kopplin, P., Witt, M., Kaiser, K., Kettrup, A., Hedges, J.I., 2006. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 2990-3010.

Herzprung, P., Hertkorn, N., Von Tumpling, W., Harir, M., Friese, K., Schmitt-Kopplin, P., 2014. Understanding molecular formula assignment of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry data of natural organic matter from a chemical point of view. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 7977-7987.

Ho, Y.B., Zakaria, M.P., Latif, P.A., Saari, N., 2014a. Determination of Veterinary Pharmaceuticals Residue in Soil and Biological Materials: A Review of Current Analytical Methods, in: Aris, A.Z., Tengku Ismail, T.H., Harun, R., Abdullah, A.M., Ishak, M.Y. (Eds.), *From Sources to Solution: Proceedings of the International Conference on Environmental Forensics 2013*. Springer Singapore, Singapore, pp. 181-186.

Ho, Y.B., Zakaria, M.P., Latif, P.A., Saari, N., 2014b. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia. *Science of The Total Environment* 488–489, 261-267.

Hockaday, W.C., Grannas, A.M., Kim, S., Hatcher, P.G., 2006. Direct molecular evidence for the degradation and mobility of black carbon in soils from ultrahigh-resolution mass spectral analysis of dissolved organic matter from a fire-impacted forest soil. *Organic Geochemistry* 37, 501-510.

Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, 358-373.

Howard, S.J., Catchpole, M., Watson, J., Davies, S.C., 2013. Antibiotic resistance: global response needed. *The Lancet. Infectious Diseases* 13, 1001-1003.

Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution* 158, 2992-2998.

Hughey, C.A., Hendrickson, C.L., Rodgers, R.P., Marshall, A.G., Qian, K., 2001. Kendrick Mass Defect Spectrum: A Compact Visual Analysis for Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra. *Analytical Chemistry* 73, 4676-4681.

Ikeya, K., Sleighter, R.L., Hatcher, P.G., Watanabe, A., 2015. Characterization of the chemical composition of soil humic acids using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 153, 169-182.

Jansen, S.A., Malaty, M., Nwabara, S., Johnson, E., Ghabbour, E., Davies, G., Varum, J.M., 1996. Structural modeling in humic acids. *Materials Science and Engineering: C* 4, 175-179.

Jenny, H., Gessel, S.P., Bingham, F.T., 1949. Comparative study of decomposition rates of organic matter in temperate and tropical regions. *Soil Science* 68, 419-432.

Kahle, M., Stamm, C., 2007a. Sorption of the Veterinary Antimicrobial Sulfathiazole to Organic Materials of Different Origin. *Environmental Science & Technology* 41, 132-138.

Kahle, M., Stamm, C., 2007b. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere* 68, 1224-1231.

Kalinichev, A.G., Kirkpatrick, R.J., 2007. Molecular dynamics simulation of cationic complexation with natural organic matter. *European Journal of Soil Science* 58, 909-917.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8, 1-13.

Khan, S.J., Ongerth, J.E., 2004. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* 54, 355-367.

Kim, S., Kramer, R.W., Hatcher, P.G., 2003. Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van Krevelen Diagram. *Analytical Chemistry* 75, 5336-5344.

Koch, B.P., Dittmar, T., 2006. From mass to structure: An aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 926-932.

Koch, B.P., Dittmar, T., Witt, M., Kattner, G., 2007. Fundamentals of molecular formula assignment to ultrahigh resolution mass data of natural organic matter. *Analytical Chemistry* 79, 1758-1763.

Kong, J., Wei, X.-Y., Yan, H.-L., Li, Z.-K., Zhao, M.-X., Li, Y., Zong, Z.-M., 2015. Analysis of extractable basic nitrogen compounds in Buliangou subbituminous coal by positive-ion ESI FT-ICR MS. *Fuel* 159, 385-391.

Kononova, M.M., 1963. Soil Organic Matter. *Soil Science* 95, 90.

Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.-M., Schlöter, M., 2008. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental and Pollution* 153.

Kramer, R.W., Kujawinski, E.B., Hatcher, P.G., 2004. Identification of Black Carbon Derived Structures in a Volcanic Ash Soil Humic Acid by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* 38, 3387-3395.



Kujawinski, E.B., 2002. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI FT-ICR MS): Characterization of complex environmental mixtures. *Environmental Forensics* 3, 207-216.

Kujawinski, E.B., Behn, M.D., 2006. Automated analysis of electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of natural organic matter. *Analytical Chemistry* 78, 4363-4373.

Kujawinski, E.B., Freitas, M.A., Zang, X., Hatcher, P.G., Green-Church, K.B., Jones, R.B., 2002. The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter. *Organic Geochemical* 33, 171-180.

Kujawinski, E.B., Hatcher, P.G., Freitas, M.A., 2001. High-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Humic and Fulvic Acids: Improvements and Comparisons. *Analytical Chemistry* 74, 413-419.

Kulikova, N.A., Perminova, I.V., 2002. Binding of Atrazine to humic substances from Soil, Peat, and Coal related to their structure. *Environmental Science & Technology* 36, 3720-3724.

Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M., Woodford, N., 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 10, 597-602.

Kuráň, P., Trögl, J., Nováková, J., Pilařová, V., Dáňová, P., Pavlorková, J., Kozler, J., Novák, F., Popelka, J., 2014. Biodegradation of Spilled Diesel Fuel in Agricultural Soil: Effect of Humates, Zeolite, and Bioaugmentation. *The Scientific World Journal* 2014, 642427.

Leal, R.M.P., Alleoni, L.R.F., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere* 92, 979-985.

Leal, R.M.P., Figueira, R.F., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2012. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the total Environment* 432, 344-349.

Leenheer, J.A., Rostad, C.E., Gates, P.M., Furlong, E.T., Ferrer, I., 2001. Molecular Resolution and Fragmentation of Fulvic Acid by Electrospray Ionization/Multistage Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 73, 1461-1471.

Li, X.-W., Xie, Y.-F., Li, C.-L., Zhao, H.-N., Zhao, H., Wang, N., Wang, J.-F., 2014. Investigation of residual fluoroquinolones in a soil–vegetable system in an intensive vegetable cultivation area in Northern China. *Science of the total Environment* 468–469, 258-264.

Lian, F., Sun, B., Chen, X., Zhu, L., Liu, Z., Xing, B., 2015. Effect of humic acid (HA) on sulfonamide sorption by biochars. *Environmental Pollution* 204, 306-312.

Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizão, F.J., Petersen, J., Neves, E.G., 2006a. Black Carbon Increases Cation Exchange Capacity in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 70, 1719-1730.

Liang, C., Dang, Z., Xiao, B., Huang, W., Liu, C., 2006b. Equilibrium sorption of phenanthrene by soil humic acids. *Chemosphere* 63, 1961-1968.

Limousin, G., Gaudet, J.P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., Krimissa, M., 2007. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry* 22, 249-275.

MacCarthy, P., 2001. The principles of humic substances. *Soil Science* 166, 738-751.

MacKay, A.A., Seremet, D.E., 2008. Probe Compounds to Quantify Cation Exchange and Complexation Interactions of Ciprofloxacin with Soils. *Environmental Science & Technology* 42, 8270-8276.

Marques, F.A., Calegari, M.R., Vidal-Torrado, P., Buurman, P., 2011. Relationship between soil oxidizable carbon and physical, chemical and mineralogical properties of umbric ferralsols. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35, 25-40.

Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570-579.

Martínez-Mejía, Mónica J. ; Sato, Isabela ; Rath, Susanne, 2017. Sorption mechanism of enrofloxacin on humic acids extracted from Brazilian soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, 15995-16006.

Melendez-Perez, J.J., Martínez-Mejia, M.J., Eberlin, M.N., 2016. A reformulated aromaticity index equation under consideration for non-aromatic and non-condensed aromatic cyclic carbonyl compounds. *Organic Geochemistry* 95, 29-33.

Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., Tipping, E., 2001. Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances. *Environmental Science Technology* 35, 2049-2059.

Milori, D.M.B.P., Martin-Neto, L., Bayer, C., Mielniczuk, J., Bagnato, V.S., 2002. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* 167, 739-749.

Nascimento, P.C.d., Lani, J.L., Mendonça, E.d.S., Zoffoli, H.J.d.O., Peixoto, H.T.M., 2010. Teores e características da matéria orgânica de solos hidromórficos do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34, 339-348.

Nieder, R., Benbi, D., 2008. Soil organic matter characterization. *Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment*, 81-111.

Obimakinde, S., Fatoki, O., Opeolu, B., Olatunji, O., 2017. Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update. *Environmental Science Pollution Research* 24, 3274-3297.

Ohno, T., He, Z., Sleighter, R.L., Honeycutt, C.W., Hatcher, P.G., 2010. Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry and Indicator Species Analysis to Identify Marker Components of Soil- and Plant Biomass-Derived Organic Matter Fractions. *Environmental Science & Technology* 44, 8594-8600.

Ohno, T., Ohno, P.E., 2013. Influence of heteroatom pre-selection on the molecular formula assignment of soil organic matter components determined by ultrahigh resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 3299-3306.

Ohno, T., Sleighter, R.L., Hatcher, P.G., 2016. Comparative study of organic matter chemical characterization using negative and positive mode electrospray ionization ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 2497-2504.

Pan, B., Wang, P., Wu, M., Li, J., Zhang, D., Xiao, D., 2012. Sorption kinetics of ofloxacin in soils and mineral particles. *Environmental Pollution* 171, 185-190.

Parfitt, R.L., Giltrap, D.J., Whitton, J.S., 1995. Contribution of organic matter and clay minerals to the cation exchange capacity of soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 26, 1343-1355.

Pehrsson, E.C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K.M., Calderon, M., Cabrera, L., Hoyos-Arango, W., Bertoli, M.T., Berg, D.E., Gilman, R.H., Dantas, G., 2016. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature* 533, 212-216.

Pei, Z., Shan, X.-Q., Kong, J., Wen, B., Owens, G., 2010. Coadsorption of Ciprofloxacin and Cu(II) on Montmorillonite and Kaolinite as Affected by Solution pH. *Environmental Science & Technology* 44, 915-920.

Pena-Mendez, E.M., Gajdosova, D., Novotna, K., Prosek, P., Havel, J., 2005. Mass spectrometry of humic substances of different origin including those from Antarctica A comparative study. *Talanta* 67, 880-890.

Pereira, L.A., Jardim, I.C.S.F., Fostier, A.H., Rath, S., 2012. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Química Nova* 35, 159-169.

Persson, L., Alsberg, T., Kiss, G., Odham, G., 2000. On-line size-exclusion chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry of aquatic humic and fulvic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 286-292.

Peruchi, L.M., Fostier, A.H., Rath, S., 2015. Sorption of norfloxacin in soils: Analytical method, kinetics and Freundlich isotherms. *Chemosphere* 119, 310-317.

Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G., 1996. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European Journal of Soil Science* 47, 319-328.

Piccolo, A., Spiteller, M., 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 1047-1059.

Piccolo, A., Spiteller, M., Nebbioso, A., 2010. Effects of sample properties and mass spectroscopic parameters on electrospray ionization mass spectra of size-

fractions from a soil humic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 3071-3078.

Pico, Y., Andreu, V., 2007. Fluoroquinolones in soil--risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1287-1299.

Pils, J.R.V., Laird, D.A., 2007. Sorption of Tetracycline and Chlortetracycline on K- and Ca-Saturated Soil Clays, Humic Substances, and Clay-Humic Complexes. *Environmental Science & Technology* 41, 1928-1933.

Plazinski, W., Dziuba, J., Rudzinski, W., 2013. Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption* 19, 1055-1064.

Plazinski, W., Rudzinski, W., Plazinska, A., 2009. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 152, 2-13.

Poerschmann, J., Trommler, U., Nyplova, P., Morgenstern, P., Górecki, T., 2008. Complexation-flocculation of organic contaminants by the application of oxyhumolite-based humic organic matter. *Chemosphere* 70, 1228-1237.

Qi, Y., Hempelmann, R., Volmer, D.A., 2016. Two-dimensional mass defect matrix plots for mapping genealogical links in mixtures of lignin depolymerisation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 4835-4843.

Qiu, H., Lv, L., Pan, B.C., Zhang, Q.J., Zhang, W.M., Zhang, Q.X., 2009. Critical review in adsorption kinetic models. *J Zhejiang Univ-Sc A* 10, 716-724.

Rai, S.K., Riaz, A., Annemieke, F., 2014. Sorption of Pesticides and its Dependence on Soil Properties: Chemometrics Approach for Estimating Sorption, Non-First Order Degradation and Time-Dependent Sorption of Organic Chemicals in Soil. American Chemical Society, pp. 221-240.

Reemtsma, T., These, A., 2003. On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. *Analytical Chemistry* 75, 1500-1507.

Remmler, M., Georgi, A., Kopinke, F.D., 1995. Evaluation of matrix-assisted laser-desorption ionization (MALDI) time-of-flight (ToF) mass-spectrometry as a method for the determination of the molecular-mass distributions of humic acids. *European Mass Spectrometry* 1, 403-407.

Ritchie, J.D., Perdue, E.M., 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 85-96.

Rushton, J., J. Pinto Ferreira, Stärk, K., 2014. Antimicrobial Resistance. OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, Paris.

Salati, S., Papa, G., Adani, F., 2011. Perspective on the use of humic acids from biomass as natural surfactants for industrial applications. *Biotechnology Advances* 29, 913-922.

Salloum, M.J., Chefetz, B., Hatcher, P.G., 2002. Phenanthrene Sorption by Aliphatic-Rich Natural Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 36, 1953-1958.

Santos, L., Ramos, F., 2016. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in Food Science & Technology* 52, 16-30.

Santos, L.L.d., Lacerda, J.J.J., Zinn, Y.L., 2013. Partição de substâncias húmicas em solos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 37, 955-968.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.

Savory, J.J., Kaiser, N.K., McKenna, A.M., Xian, F., Blakney, G.T., Rodgers, R.P., Hendrickson, C.L., Marshall, A.G., 2011. Parts-Per-Billion Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurement Accuracy with a “Walking” Calibration Equation. *Analytical Chemistry* 83, 1732-1736.

Schaumann, G.E., 2006. Soil organic matter beyond molecular structure Part I: Macromolecular and supramolecular characteristics. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169, 145-156.

Scheffer, F., 1962. Kononova, M. M.: “Soil Organic Matter”. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. (Die organische Substanz des Bodens, ihre Eigenschaften und Bedeutung für die Bodenbildung und die Bodenfruchtbarkeit.) Übersetzt aus dem Russischen von T. Z. Nowakowski, Pergamon Press, Oxford—London—New York—Paris 1961 (gebunden: 80 Schilling oder 15 Dollar). *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde* 98, 64-65.

Schmidt, F., Elvert, M., Koch, B.P., Witt, M., Hinrichs, K.-U., 2009. Molecular characterization of dissolved organic matter in pore water of continental shelf sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 3337-3358.

Schmitt-Kopplin, P., Gabelica, Z., Gougeon, R.D., Fekete, A., Kanawati, B., Harir, M., Gebefuegi, I., Eckel, G., Hertkorn, N., 2010. High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2763-2768.

Schulten, H.-R., Schnitzer, M., 1995. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften* 82, 487-498.

Schwarz, J., Thiele-Bruhn, S., Eckhardt, K.-U., Schulten, H.-R., 2012. Sorption of Sulfonamide Antibiotics to Soil Organic Sorbents: Batch Experiments with Model Compounds and Computational Chemistry. *ISRN Soil Science* 2012, 10.

Shakoor, S., Tahseen, S., Jabeen, K., Fatima, R., Malik, F.R., Rizvi, A.H., Hasan, R., 2016. Fluoroquinolone consumption and -resistance trends in



*Mycobacterium tuberculosis* and other respiratory pathogens: Ecological antibiotic pressure and consequences in Pakistan, 2009–2015. *International Journal of Mycobacteriology* 5, 412-416.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/>. Acesso em junho de 2017.

Simpson, A., x000E, Kingery, W., Hayes, M., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M., Hofmann, M., 2002. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* 89, 84-88.

ŠMejkalová, D., Spaccini, R., Piccolo, A., 2008. Multivariate analysis of CPMAS <sup>13</sup>C-NMR spectra of soils and humic matter as a tool to evaluate organic carbon quality in natural systems. *European Journal of Soil Science* 59, 496-504.

Solos, EMBRAPA., 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro.

Stenberg, B., Viscarra Rossel, R.A., Mouazen, A.M., Wetterlind, J., 2010. Visible and Near Infrared Spectroscopy in Soil Science. 107, 163-215.

Stenson, A.C., Landing, W.M., Marshall, A.G., Cooper, W.T., 2002. Ionization and Fragmentation of Humic Substances in Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 4397-4409.

Stoob, K., Singer, H.P., Stettler, S., Hartmann, N., Mueller, S.R., Stamm, C.H., 2006. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1128, 1-9.

Stubbins, A., Spencer, R.G.M., Chen, H., Hatcher, P.G., Mopper, K., Hernes, P.J., Mwamba, V.L., Mangangu, A.M., Wabakanghanzi, J.N., Six, J., 2010. Illuminated darkness: Molecular signatures of Congo River dissolved organic matter and its photochemical alteration as revealed by ultrahigh precision mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1467-1477.

Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Rivagli, E., Profumo, A., 2010. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. *Journal of Chromatography A* 1217, 7316-7322.

Stürmer, S.L.K., Rossato, O.B., Copetti, A.C.C., dos Santos, D.R., Calegari, A., Brum, B., 2011. Soil organic carbon variations due to deforestation and natural regeneration. *Ciencia Florestal* 21, 241-250.

Subbiah, M., Mitchell, S.M., Call, D.R., 2016. Not All Antibiotic Use Practices in Food-Animal Agriculture Afford the Same Risk. *Journal of Environmental Quality* 45, 618-629.

Sukul, P., Spiteller, M., 2006. Sulfonamides in the Environment as Veterinary Drugs, in: Ware, G.W. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. Springer New York, New York, NY, pp. 67-101.

Sutton, R., Sposito, G., 2005. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology* 39, 9009-9015.

Suzuki, S., Hoa, P.T.P., 2012. Distribution of Quinolones, Sulfonamides, Tetracyclines in Aquatic Environment and Antibiotic Resistance in Indochina. *Frontiers in Microbiology* 3.

Tan, Y., Guo, Y., Gu, X., Gu, C., 2015. Effects of metal cations and fulvic acid on the adsorption of ciprofloxacin onto goethite. *Environmental Science Pollution Research* 22, 609-617.

Tapsall, J.W., 2009. *Neisseria gonorrhoeae* and emerging resistance to extended spectrum cephalosporins. *Current Opinion in Infectious Diseases* 22, 87-91.

Tatzber, M., Stemmer, M., Splegel, H., Katziberger, C., Haberhauer, G., Mentler, A., Gerzabek, M.H., 2007. FTIR-spectroscopic characterization of humic

acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extraction procedures. *J Plant Nutr Soil Sc* 170, 522-529.

Teixidó, M., Medeiros, J., Beltrán, J., Prat, M.D., Granados, M., 2014. Sorption of enrofloxacin and ciprofloxacin in agricultural soils: Effect of organic matter. *Adsorption Science and Technology* 32, 153-163.

ter Laak, T.L., Gebbink, W.A., Tolls, J., 2006. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 904-911.

Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4, 493-499.

These, A., Reemtsma, T., 2003. Limitations of Electrospray Ionization of Fulvic and Humic Acids as Visible from Size Exclusion Chromatography with Organic Carbon and Mass Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry* 75, 6275-6281.

Tivet, F., de Moraes Sá, J.C., Lal, R., Milori, D.M.B.P., Briedis, C., Letourmy, P., Pinheiro, L.A., Borszowski, P.R., da Cruz Hartman, D., 2013a. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. *Geoderma* 207–208, 71-81.

Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2010. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior* 5, 635-643.

Uivarosi, V., 2013. Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update. *Molecules* 18, 11153.

Uyguner, C.S., Bekbolet, M., 2005. Implementation of spectroscopic parameters for practical monitoring of natural organic matter. *Desalination* 176, 47-55.

Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 742-750.

Van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Covaci, A., 2011. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1218, 5964-5974.

Vancampenhout, K., Wouters, K., De Vos, B., Buurman, P., Swennen, R., Deckers, J., 2009. Differences in chemical composition of soil organic matter in natural ecosystems from different climatic regions - A pyrolysis-GC/MS study. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 568-579.

Vasudevan, D., Bruland, G.L., Torrance, B.S., Upchurch, V.G., MacKay, A.A., 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 151, 68-76.

Vieira, A.P., Rath, S., Fostier, A.H., 2017. Sorption of Sulfachloropyridazine in Brazilian Soils. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28, 158-167.

Vieira, A.P. e Fostier, A.H., 2016. Tese de doutorado: Sorção e desorção dos antimicrobianos enrofloxacin, ciprofloxacin e sulfachloropiridazina em solos do estado de São Paulo. Universidade Estadual de Campinas Campinas, Brasil.

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment* 407, 2711-2723.

Wegst-Uhrich, S., Navarro, D., Zimmerman, L., Aga, D., 2014. Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal* 8, 5.

Wu, Q., Li, Z., Hong, H., 2013a. Adsorption of the quinolone antibiotic nalidixic acid onto montmorillonite and kaolinite. *Applied Clay Science* 74, 66-73.

Wu, Q.F., Li, Z.H., Hong, H.L., Li, R.B., Jiang, W.T., 2013b. Desorption of ciprofloxacin from clay mineral surfaces. *Water Research* 47, 259-268.

Wu, Z., Rodgers, R.P., Marshall, A.G., 2004. Two- and Three-Dimensional van Krevelen Diagrams: A Graphical Analysis Complementary to the Kendrick Mass Plot for Sorting Elemental Compositions of Complex Organic Mixtures Based on Ultrahigh-Resolution Broadband Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurements. *Analytical Chemistry* 76, 2511-2516.

Yan, W., Zhang, J., Jing, C., 2013. Adsorption of Enrofloxacin on montmorillonite: Two-dimensional correlation ATR/FTIR spectroscopy study. *Journal of Colloid and Interface Science* 390, 196-203.

Zeledón-Toruno, Z.C., Lao-Luque, C., de las Heras, F.X.C., Sole-Sardans, M., 2007. Removal of PAHs from water using an immature coal (leonardite). *Chemosphere* 67, 505-512.

Zhang, J., Li, Z., Ge, G., Sun, W., Liang, Y., Wu, L., 2009. Impacts of soil organic matter, pH and exogenous copper on sorption behavior of norfloxacin in three soils. *Journal of Environmental Sciences* 21, 632-640.

Zhang, Q., Zhao, L., Dong, Y.-h., Huang, G.-y., 2012. Sorption of norfloxacin onto humic acid extracted from weathered coal. *Journal of Environmental Management* 102, 165-172.

Zhao, L., Dong, Y.H., Wang, H., 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment* 408, 1069-1075.

Zhong, J.Y., Sleighter, R.L., Salmon, E., McKee, G.A., Hatcher, P.G., 2011. Combining advanced NMR techniques with ultrahigh resolution mass spectrometry: A new strategy for molecular scale characterization of macromolecular

components of soil and sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 42, 903-916.

Zhurov, K.O., Kozhinov, A.N., Fornelli, L., Tsybin, Y.O., 2014. Distinguishing analyte from noise components in mass spectra of complex samples: where to cut the noise? *Analitical Chemistry* 86, 3308-3316.

---

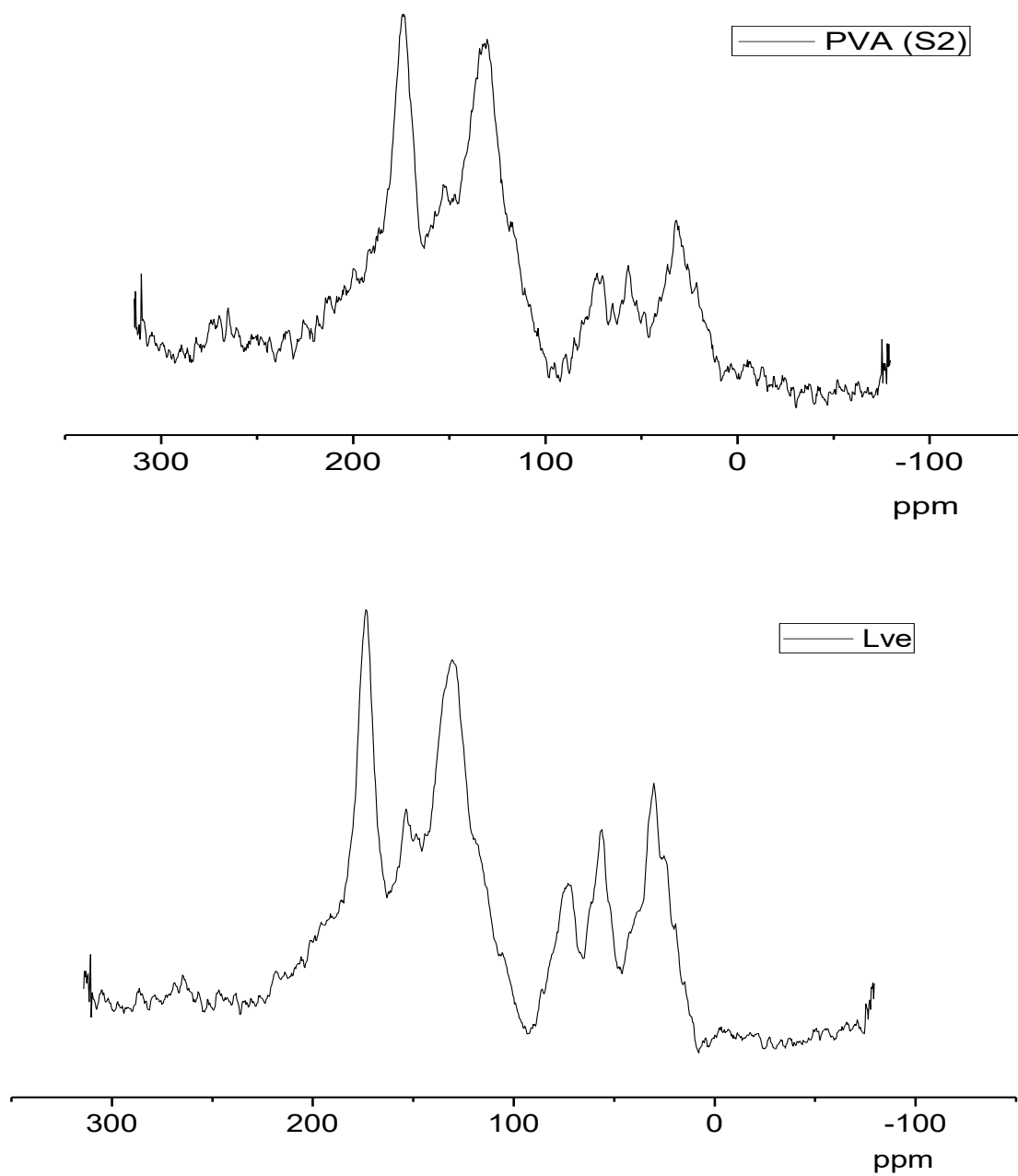
---

## ANEXOS

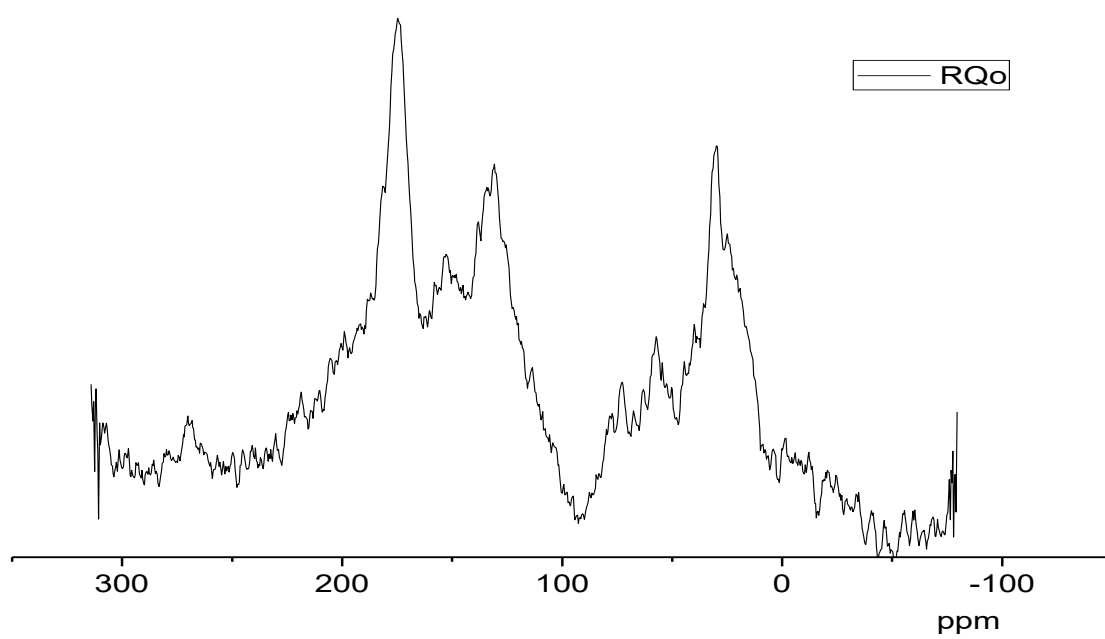
---

---

**Anexo 1.** Espectros usando a técnica de  $^{13}\text{C}$  NMR para os HA-PVA(S2), HA-LVe e HA-RQo extraídos dos solos coletados.

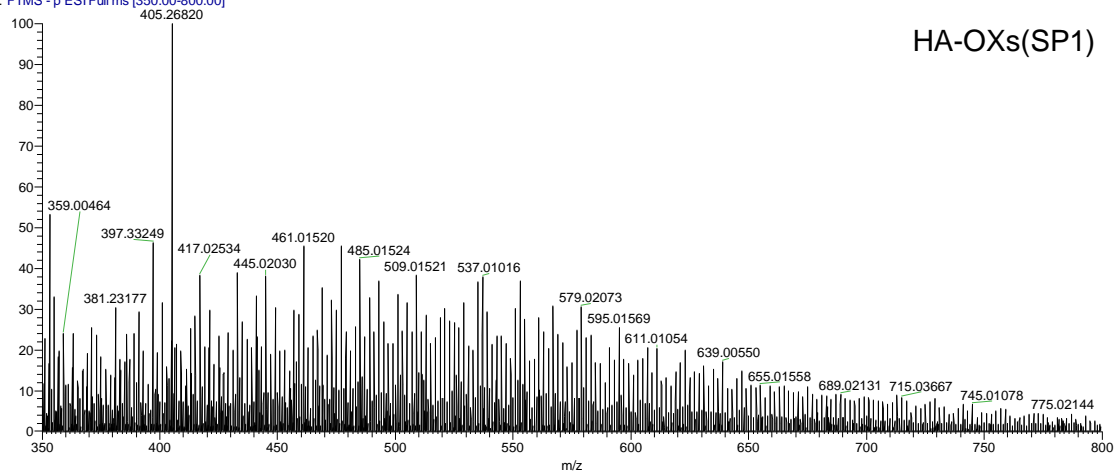




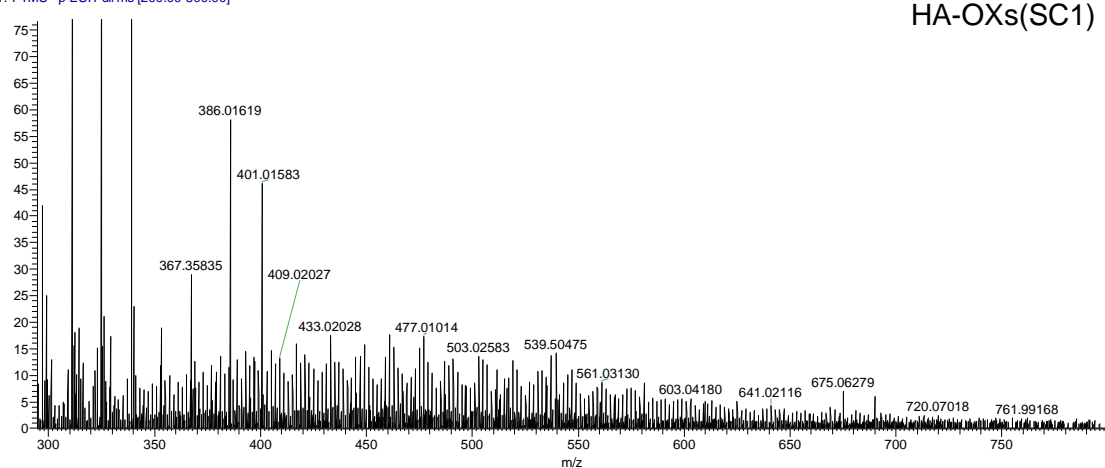


## Anexo 2. Espectros de massas de alta resolução obtidos por (-)ESI FT -ICR MS

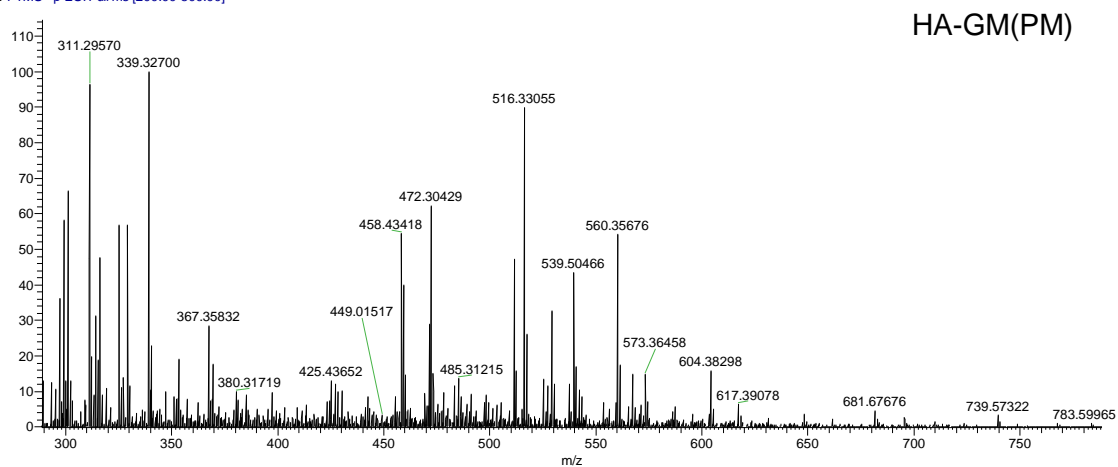
SP1HP1 C3 350800) r200\_Recal #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.27E3  
T: FTMS -p ESI Full ms [350.00-800.00]



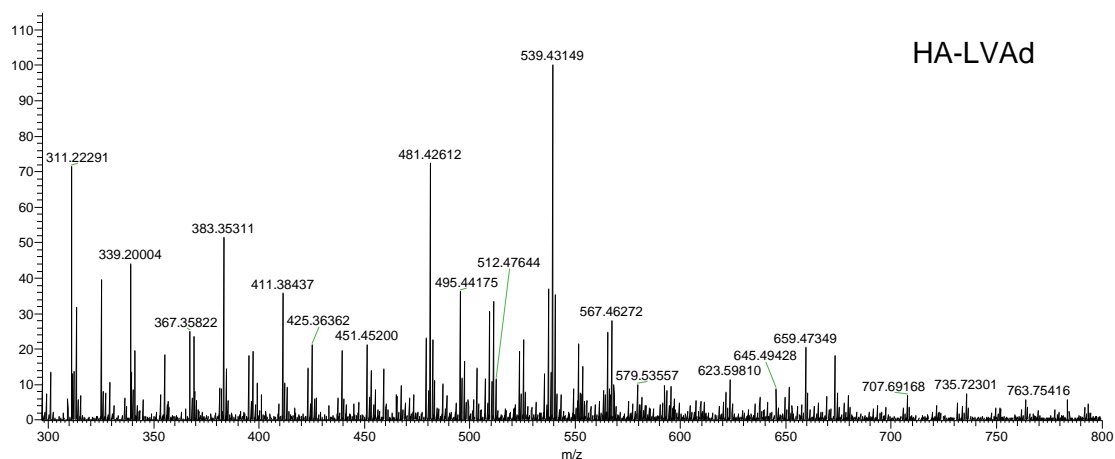
SC1H1 C3 (200-800) r200 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.34E4  
T: FTMS -p ESI Full ms [200.00-800.00]



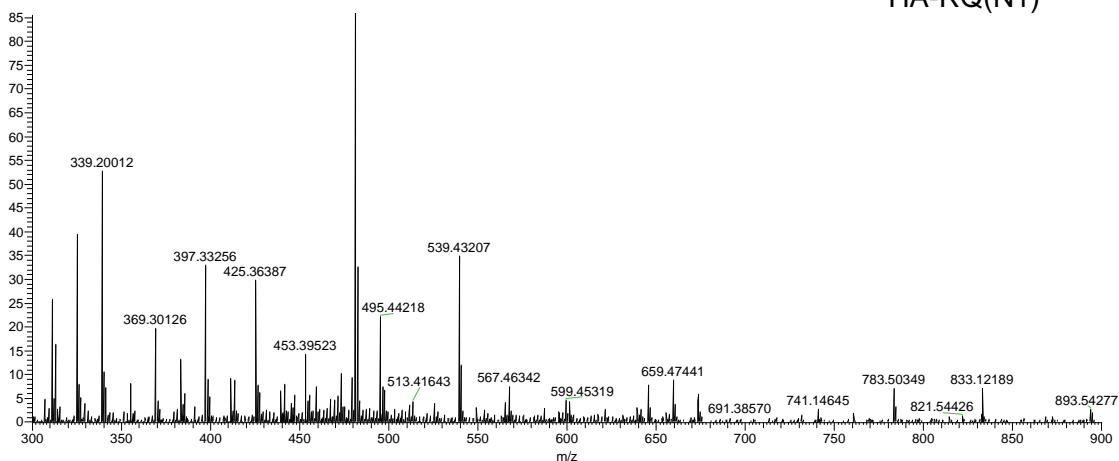
PMRO7 C3 200-800) r200 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.14E4  
T: FTMS -p ESI Full ms [200.00-800.00]



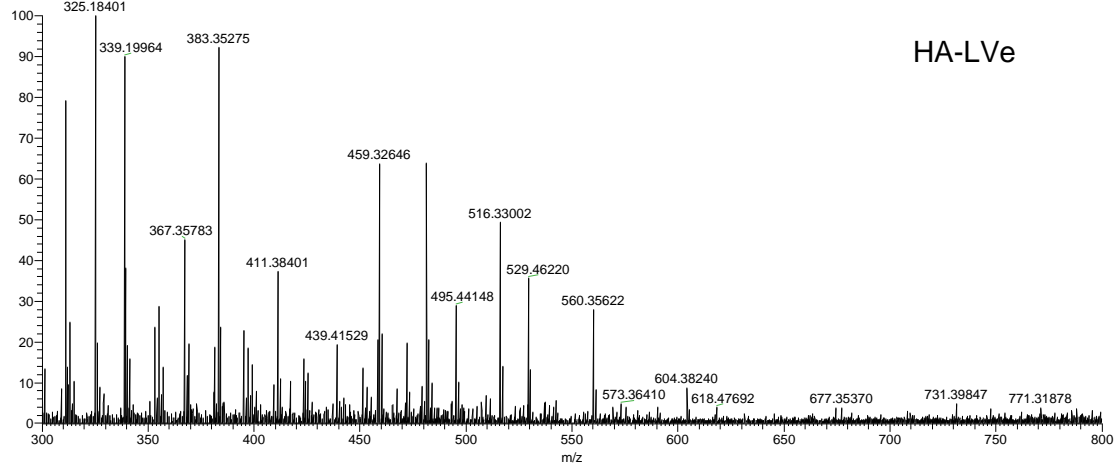
LVAD\_200\_NH4OH\_Recal #1 RT: 0.05 AV: 1 NL: 3.84E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [250.00-800.00]



n1 10 (1) #86-97 RT: 0.32-1.97 AV: 12 NL: 7.30E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-900.00]

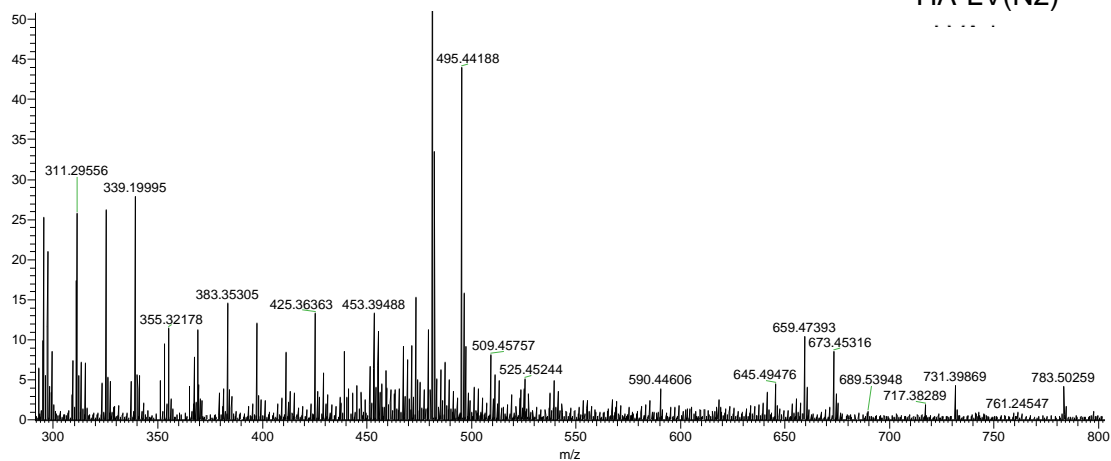


LVe\_NH4OH\_10v\_300a800 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.22E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [300.00-800.00]



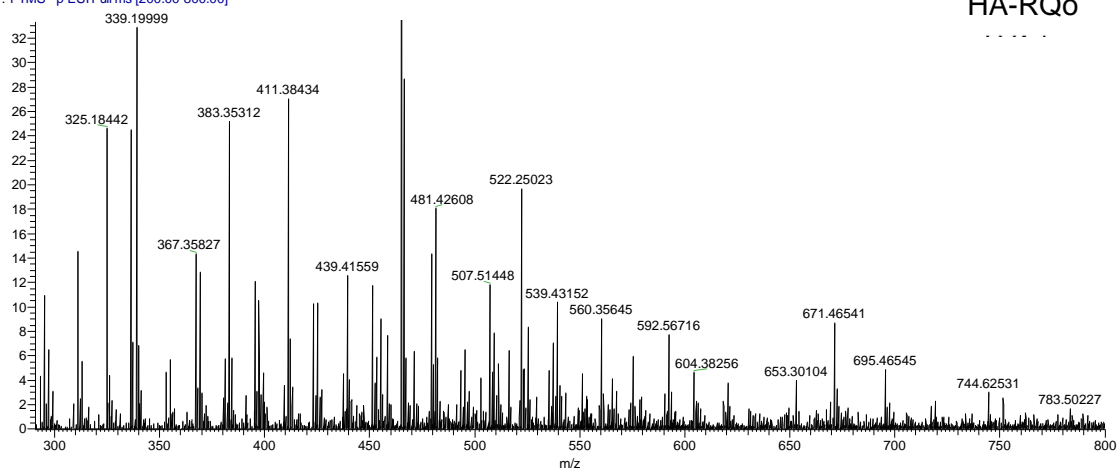
N2 C2\_Recal #49 RT: 0.10 AV: 1 NL: 1.72E5  
T: FTMS - p ESI sid=35.00 Full ms [225.00-1000.0]

HA-LV(N2)



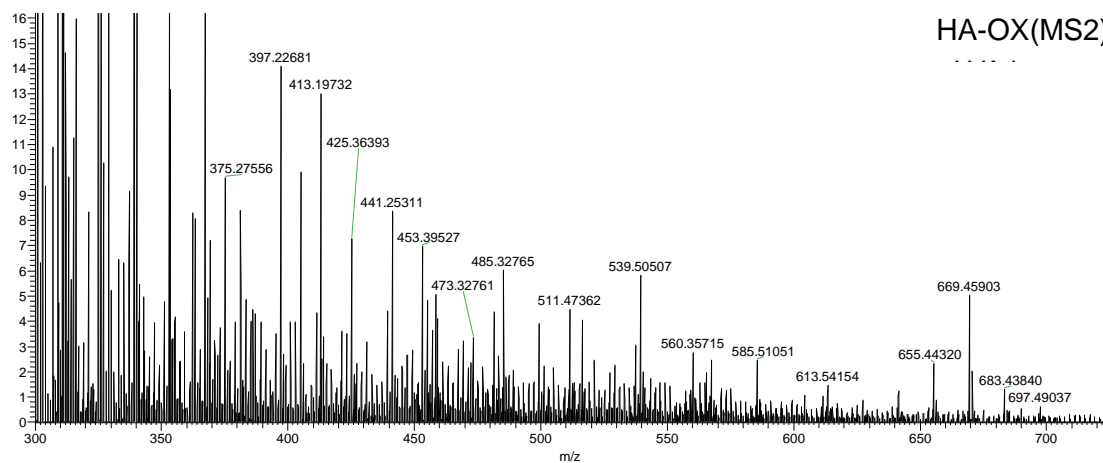
RQo\_200\_Nh4oh\_10ml\_Recal #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 4.73E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-800.00]

HA-RQo

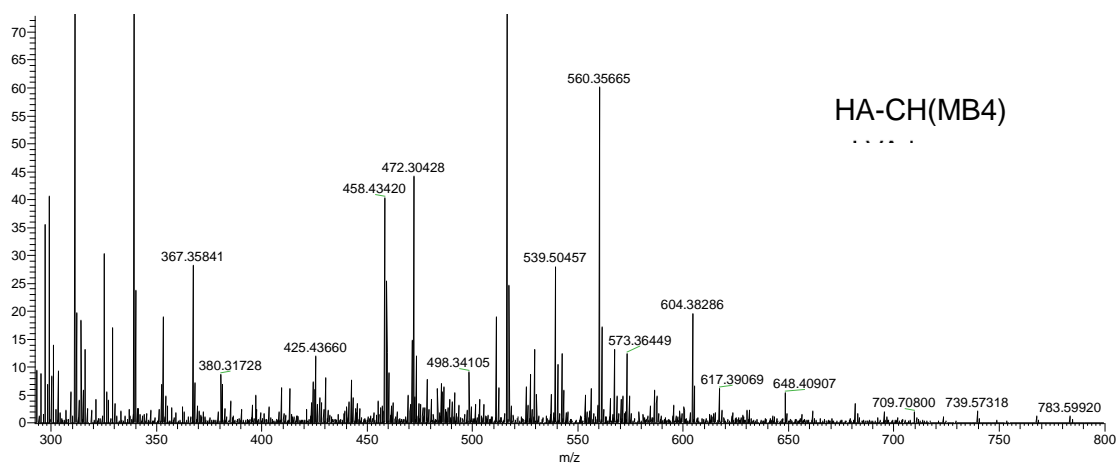


MS2HD1 C3 (300-800) r100 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.48E3  
T: FTMS - p ESI Full ms [300.00-800.00]

HA-OX(MS2)



MB4A C3 (200-800) r200\_Recal #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.21E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-800.00]



Branco (MeOH-Agua)

branco2 (meOH\_NaOH) #1 RT: 17.81 AV: 1 NL: 6.86E2  
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-800.00]

